

No English title available.

Veröffentlichungsnr. (Sek.) DE19932688
Veröffentlichungsdatum : 2001-01-18
Erfinder : RUDOLPH RAINER [DE]; FIEDLER ULRIKE [DE]; BOEHM GERALD [DE]; REIMANN CAROLA [DE]
Anmelder : FIEDLER ULRIKE [DE]; RUDOLPH RAINER [DE]
Veröffentlichungsnummer : DE19932688
Aktenzeichen:
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19991032688 19990713
Prioritätsaktenzeichen:
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19991032688 19990713
Klassifikationssymbol (IPC) : C07K14/435
Klassifikationssymbol (EC) : C07K14/00, C07K14/435, C07K14/47
Korrespondierende Patentschriften
AU5827800, CA2378871, CN1371415, EP1200583
(WO0104144), A3, JP2003504081T, WO0104144

Bibliographische Daten

The invention relates to novel beta-pleated sheet proteins with specific binding and catalytic properties.
The invention also relates to a method for producing proteins of this type.

Daten aus der **esp@cenet** Datenbank -- I2



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑯ DE 199 32 688 A 1

⑮ Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/435

DE 199 32 688 A 1

⑯ Aktenzeichen: 199 32 688.6
⑯ Anmeldetag: 13. 7. 1999
⑯ Offenlegungstag: 18. 1. 2001

⑰ Anmelder:
Fiedler, Ulrike, Dr., 01309 Dresden, DE; Rudolph,
Rainer, Prof.Dr., 06114 Halle, DE

⑰ Vertreter:
PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner, 80801
München

⑰ Erfinder:
Rudolph, Rainer, Prof. Dr., 06114 Halle, DE; Fiedler,
Ulrike, Dr., 01217 Dresden, DE; Böhm, Gerald,
06114 Halle, DE; Reimann, Carola, 06114 Halle, DE

⑮ Entgegenhaltungen:
Biochemistry 1990, 29, S. 9988-9993;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑯ Design von Beta-Faltblatt-Proteinen mit spezifischen Bindungseigenschaften
⑯ Die vorliegende Erfindung beschreibt neuartige Beta-Faltblatt-Proteine mit spezifischen Bindungseigenschaften und katalytischen Eigenschaften sowie Verfahren zur Herstellung dieser Proteine.

DE 199 32 688 A 1

DE 199 32 688 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Beta-Faltblatt-Proteine mit neuen oder verbesserten spezifischen Bindungseigenschaften oder einer neuen oder verbesserten katalytischen Aktivität sowie Verfahren zur Herstellung derartig modifizierter Proteine.

Antikörper und deren Derivate werden in vielen Bereichen der humanen und veterinären Therapie, Diagnostik sowie beim Monitoring eingesetzt. Ein Problem bei der Nutzung der natürlich vorkommenden Antikörper ist deren Herstellung. Nach wie vor erfolgt die Produktion der Antikörper im tierischen Zellkultursystem, ein Verfahren, das sehr kostenintensiv ist. Für einige Anwendungen, wie z. B. die Herstellung von Fusionsproteinen oder ein Einsatz in der Therapie, der eine schnelle Blut-clearance und gute Gewebepenetration notwendig macht, stellt die Größe der natürlich vorkommenden Antikörpermoleküle ein weiteres Problem dar (Colcher et al., 1998). Rekombinante Antikörpermoleküle, wie scFv's (Bird et al., 1988), Miniantikörper (Pack und Plückthun, 1992) oder bispezifische Antikörper (Holliger und Winter, 1993) sind größtenteils nur noch aus den antigenbindenden Domänen der Antikörper (VH und VL) aufgebaut. Aufgrund ihrer erheblich verringerten Größe zeigen sie eine verbesserte Gewebepenetration und sind auch für Fusionen mit anderen Proteinen besser als vollständige Antikörper geeignet. Gegenüber diesen sind rekombinante Antikörperfragmente allerdings oft instabiler, haben geringere Affinitäten, und sind aufgrund der auszubildenden Disulfidbrücken schwer rekombinant herzustellen. Methoden zur Stabilisierung und verbesserten Affinität der rekombinanten Antikörperfragmente beinhalten u. a. die Testung verschiedener Linkerpeptide und die Einführung von Disulfidverbrückungen (Glockshuber et al., 1990, Cumber et al., 1992, Brinkmann, 1997).

Die Sequenz und Länge der Linkerpeptide kann sowohl die Stabilität gegenüber Proteasen als auch die Affinität der Antikörperfragmente beeinflussen (Pantoliano et al., 1991). Die Einführung von zusätzlichen Disulfidverbrückungen in die konservierten framework-Regionen der variablen Domänen kann zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Hitze (Young et al., 1995) und denaturierenden Agenzien, sowie zu verbesserten Ausbeuten bei heterologer Expression führen. Generell zeigen viele scFv's jedoch eine geringe Stabilität und neigen bereits bei 37°C zur Aggregation. Die Instabilität kann ebenfalls durch die Verwendung der allgemeinen Fv-Fragment-Klonierungsprimer verursacht werden, durch die neue destabilisierende Mutationen eingeführt werden können. Die Produktion der Antikörperfragmente im bakteriellen System erfolgt meist durch Ausschleusen in den periplasmatischen Raum, wobei auch hier Optimierungen hinsichtlich des Redoxzustandes bzw. der gleichzeitigen Expression von Faltungshelfern möglich sind.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Proteine bereitzustellen, die neue oder verbesserte Bindungseigenschaften, beispielsweise antikörperähnliche Eigenschaften, aufweisen, gleichzeitig jedoch die oben beschriebenen Nachteile vollständiger oder rekombinanter Antikörpermoleküle nicht zeigen.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt darin, Proteine bereitzustellen, die neue oder verbesserte enzymatische bzw. katalytische Eigenschaften zeigen.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt in der Schaffung von Verfahren zur Bildung der oben genannten Proteine.

Die oben genannten Aufgaben werden durch ein Protein mit den in Anspruch 1 gekennzeichneten Merkmalen gelöst. Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Proteine ergibt sich aus dem Anspruch 16. Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen und der nachfolgenden Beschreibung.

Durch Veränderung der Oberfläche eines Beta-Faltblatt-Proteins werden neuartige, vorher nicht vorhandene Bindungseigenschaften im Protein erzeugt. Diese Bindungseigenschaften werden durch Mutagenese eines Beta-Faltblatt-Bereiches geschaffen. Die neuartigen Beta-Faltblatt-Proteine sind trotz der de novo Bindungseigenschaften den Ausgangsproteinen in Struktur und Stabilität ähnlich. Ausgangsproteine für das Design der neuartigen Bindungsmoleküle sind Proteine mit einer überwiegenden Beta-Faltblatt-Struktur, wie z. B. das Gamma-Kristallin, ein Strukturprotein der Augenlinse. Basierend auf der Kristallstruktur werden z. B. mittels Computeranalysen Bereiche und Aminosäuren im Beta-Faltblatt der Ausgangsproteine ausgewählt, die oberflächenexponiert und damit dem Lösungsmittel bzw. möglichen Bindungspartnern zugänglich sind. In dem für das Ausgangsprotein kodierenden Gen werden diese Bereiche bzw. Aminosäurepositionen mit gentechnischen Methoden mutagenisiert. Auf DNA-Ebene wird so eine Vielzahl an mutierten Genen (Bank oder Bibliothek), die für die unterschiedlichen Beta-Faltblatt-Protein-Mutanten kodieren, hergestellt. Die Isolierung von Mutanten mit neuartigen, gewünschten Bindungseigenschaften erfolgt mit Hilfe eines geeigneten Selektionssystems, wie z. B. dem Phage Display System. Beim Phage Display wird die Gesamtheit der erstellten Protein-Mutanten auf der Oberfläche von Bakteriophagen exponiert (Phage Display-Bank). Diese rekombinanten Phagen werden hinsichtlich ihrer Bindung an die gewünschten Zielmoleküle untersucht. Phagen, die auf ihrer Oberfläche Beta-Faltblatt-Mutanten mit einer spezifischen Bindung zum Zielmolekül exponieren, werden durch wiederholtes Screening angereichert und isoliert. Gene, die für bindende Beta-Faltblatt-Mutanten kodieren, werden von den Phagen erhalten und in einem geeigneten Expressionssystem, wie z. B. E. coli, exprimiert. Mit dem beschriebenen Verfahren gelingt es überraschenderweise, aus Beta-Faltblatt-Proteinen, welche keinerlei spezifische Bindungseigenschaften aufweisen, spezifisch bindende Proteine herzustellen, wobei Mutanten mit der gewünschten Spezifität aus der Bibliothek durch Anwendung eines geeigneten Screeningverfahrens isoliert werden. In Abhängigkeit von den Eigenschaften des Ausgangsproteins haben die mit dem beschriebenen System erstellten Beta-Faltblatt-Mutanten z. B. gegenüber Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten Vorteile hinsichtlich der Größe, Stabilität und funktionell aktiver Produktion im heterologen, vorzugsweise bakteriellen System. Diese verbesserten Eigenschaften der neuartigen Beta-Faltblatt-Mutanten ermöglichen es, z. B. Antikörper, rekombinante Antikörperfragmente oder katalytische Antikörper zu ersetzen sowie ganz neue Anwendungsbereiche zu erschließen.

Die erfindungsgemäße Lösung beispielsweise der dargestellten Antikörperproblematik liegt im Design von Proteinen mit jeweils spezifischen Bindungseigenschaften, die eine hohe Stabilität gegenüber geringen pH-Werten, denaturierenden Agenzien und erhöhte Temperatur aufweisen, d. h. die Bedingungen standhalten, bei denen Antikörper instabil sind. Die Schaffung von Proteinen mit Beta-Faltblatt-Struktur mit antikörperähnlichen Bindungseigenschaften ist aber nur ein mögliches Anwendungsbereich der vorliegenden Erfindung. Weitere Anwendungsmöglichkeiten erschließen sich bei-

DE 199 32 688 A 1

spielsweise bei der Schaffung von Beta-Faltblatt-Proteinen mit neuen katalytischen Eigenschaften, z. B. Resistenz-eigen-schaften und fluoreszierenden Eigenschaften. Ein Beispiel für ein Protein, dessen fluoreszierende Eigenschaften veränderbar sind, ist das GFP. Kleine Proteine mit einer natürlicherweise hohen Stabilität sind für das Design besonders geeignet. Durch Veränderung ihrer Oberfläche wurden erfahrungsgemäß, unter Beibehaltung der Stabilität, beispielhaft neue spezifische Bindungseigenschaften im Protein erzeugt.

Erfahrungsgemäß wurden als eine mögliche Klasse stabiler Proteine beispielhaft Kristalline ausgewählt. Kristalline, die Strukturproteine der Augenlinsen, unterliegen üblicherweise keinem zellulären "turnover" und weisen demzufolge auch außerordentliche Stabilitäts-eigenschaften auf (Mandel et al., 1987, Rudolph et al., 1990). Gamma-Kristalline, eine Klasse der Kristalline bei Vertebraten, sind monomere Proteine mit einer Molekularmasse von etwa 22 kDa. Das Hauptstrukturmotiv der Gamma-Kristalline ist das antiparallele Beta-Faltblatt (Hazes und Hol, 1992, Richardson et al., 1992, Hemmingsen et al., 1994). Gamma-Kristalline bestehen aus zwei sehr ähnlichen globulären Domänen, einer N- und einer C-terminalen Domäne, die miteinander durch ein V-förmiges Linkerpeptid verbunden sind. Das für Gamma-Kristalline charakteristische Faltungsmuster ("Greek-Key"-Motiv, Slingsby, 1985, Wistow und Piatigorsky, 1988) ist höchstwahrscheinlich die Ursache für die beträchtliche Thermostabilität sowie die Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln (Mandal et al., 1987). Das Gamma-II-Kristallin aus Kälberaugen ist ein 21 kDa-Protein mit für seine Größe ungewöhnlich vielen (7) Cysteinen, die unter physiologischen Bedingungen reduziert vorliegen.

Gamma-II-Kristallin weist im normal gefalteten Zustand keinerlei Bindungseigenschaften auf. Die erfahrungsgemäß Veränderung (Mutagenese) einer ausgewählten, lösungsmittel-exponierten Region dieses Proteins, die aus dem Strukturmotiv des Beta-Faltblattes besteht, führte überraschenderweise zur Veränderung der Oberflächenstruktur und dem Ladungsmuster des Proteins und somit zur Herstellung neuer Bindungseigenschaften. Dabei wurden nur Bereiche oder Aminosäurepositionen ausgewählt, die nicht maßgeblich an der Strukturerhaltung des Proteins beteiligt sind. Die Mutagenese eines kleinen Beta-Faltblatt-Proteins (Riddle et al., 1997) hat gezeigt, daß Proteine trotz erheblicher Sequenzänderungen zu einem hohen Prozentsatz korrekt die native Struktur des Beta-Faltblattes ausbilden können.

Ansätze zur Mutagenese von bestimmten Proteinbereichen mit dem Ziel der Isolierung von Molekülen mit verbesserten oder neuen Bindungseigenschaften existierten bereits für rekombinante Antikörperfragmente (Nissim et al., 1994, de Kruijff et al., 1995), für Proteine mit bereits vorhandenen Bindungseigenschaften (Rezeptoren, Inhibitorproteine, DNA-bindende Proteine) sowie für peptide libraries (Cortese et al., 1995, Haaparanta und Huse 1995, McConell et al., 1996). Im Falle der Antikörper werden nur die antigenbindenden Domänen, die als loop-Regionen vorliegen, mutagenisiert. Dies ist ebenfalls für die meisten anderen Proteine, wie z. B. Tendamistat (McConell und Hoess, 1995) oder Cytochrome b₅₆₂ (Ku und Schultz, 1995), der Fall. Auch hier werden loop-Regionen mutagenisiert. Beispiele für Mutagenesen in alpha-Helices sind die Z-Domäne vom Protein A (Nord et al., 1997) und die Zinkfingerdomäne CP-1 (Choo und Klug, 1995). Bei den bisherigen Mutagenesen wurde lediglich die Spezifität der Bindung verändert, wobei immer von Proteinen mit bereits vorhandenen Bindungseigenschaften ausgegangen wurde. In keinem Fall wurde ein Protein ohne Bindungseigenschaften verwendet, noch wurde ein Beta-Faltblatt-Strukturmotiv gezielt verändert. Bei dem hier beschriebenen Verfahren wurde erstmals an einem Protein ohne jegliche Bindungseigenschaften in dem starren Bereich des Beta-Faltblattes eine gezielte Mutagenese durchgeführt. Dadurch wurde unerwarteterweise ein Protein mit erheblicher Stabilität und mit spezifischen Bindungseigenschaften, vergleichbar mit Antikörpermolekülen, erzeugt.

Als geeignetes System für die Isolierung mutagenisierter Beta-Faltblatt-Proteine mit neu entstandenen Bindungseigenschaften dient das Phage Display-System. Das System ermöglicht ein sehr effizientes Screening eines großen Repertoires an Proteinvarianten auf spezifische Bindungseigenschaften (Smith, 1985). Dabei wird jeweils eine Proteinvariante auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen dargestellt und kann mit den Zielmolekülen, die an einer Festphase immobilisiert sind, in Wechselwirkung treten. An das Zielmolekül bindende Proteine können durch Elution der Phagen erhalten werden. Nach Isolierung der Phagen-DNA kann die DNA-Sequenz der spezifisch bindenden Proteinvarianten bestimmt werden. Neben dem Phage Display System können auch andere Selektions-Systeme, wie z. B. das Bakterien-Display (Stahl und Uhlen, 1997) oder das Ribosomen-Display (Hanes et al., 1997), Anwendung finden.

Mit der beschriebenen Erfindung gelingt es überraschenderweise, beispielsweise das sehr stabile Beta-Faltblatt-Protein Gamma-II-Kristallin durch gezielte ortsspezifische Mutagenese im Beta-Faltblatt an der Oberfläche so zu verändern, daß aus dem nicht-bindenden Protein ein Protein mit spezifischen Bindungseigenschaften entsteht. Durch eine Randomisierung von acht Aminosäurepositionen erfolgt damit erstmals eine Mutagenese in einem Gerüstmolekül innerhalb eines relativ starren Bereich des Proteins. Somit wird aus dem Beta-Faltblatt-Protein Gamma-II-Kristallin eine bezüglich ihrer spezifischen Bindungseigenschaften "antikörperähnliche" Proteinspezies hergestellt. Gamma-II-Kristallin oder andere kleine, stabile Beta-Faltblatt-Proteine können mit dem beschriebenen Verfahren generell als neuartige Gerüstmoleküle für das Design neuartiger Bindungseigenschaften verwendet werden. Die modellierten Beta-Faltblatt-Proteine können z. B. rekombinante Antikörper in verschiedenen Applikationen ersetzen. Aufgrund ihrer relativ geringen Größe (20 kDa) eignen sie sich als Fusionspartner für andere funktionelle Proteine (Herstellung multifunktioneller Proteine). Weitere Einsatzmöglichkeiten liegen in der Gentherapie, wo sie als Module für das zellspezifische Targeting der gentherapeutischen Vektoren Verwendung finden können, und in der intrazellulären Immunisierung. Weiterhin können Beta-Faltblatt-Mutanten mit katalytischen Eigenschaften in Anwendungsbereichen der Enzyme eingesetzt werden. Die Stabilität der neuartigen Bindungsproteine ermöglicht zudem Anwendungen, die derzeit mit rekombinanten Antikörpern nicht durchführbar sind, z. B. in der humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Diagnostik und Therapie, der Biosensorik und der Bioseparation. Weitere Anwendungsbereiche sind allgemein die Pharma- und Kosmetikindustrie sowie die Schadstoffanalyse und -beseitigung.

Nachfolgend werden einige bevorzugte Ausgestaltungsformen der Erfindung beschrieben.

Die erfahrungsgemäß zur Mutagenese ausgewählten Proteine mit Beta-Faltblatt-Struktur weisen entweder keine Bindungseigenschaften oder keine katalytische bzw. enzymatische Aktivität auf oder eine solche Aktivität oder solche Bindungseigenschaften, daß eine Verbesserung wünschenswert erscheint.

Proteine mit Beta-Faltblatt-Struktur sind bekannt. Ein Beispiel für eine Proteinklasse mit Beta-Faltblatt sind die Kristalline, insbesondere die Alpha-, Beta- und Gammakristalline. Grundsätzlich einsetzbar sind Kristalline aus allen Tier-

DE 199 32 688 A 1

arten, beispielsweise aus Wirbeltieren, Nagern, Vögeln und Fischen. Weitere Beispiele für Proteine mit Beta-Faltblatt-Struktur, die erfindungsgemäß mutagenisierbar sind, sind: Spheruline, Hitzestressproteine, Kälteschockproteine, Beta-Helix-Proteine, Lipocaline, Certine oder Transkriptionsfaktoren, Fibronectine, GFP, NGF, Tendamistat oder Lysozym. Erfindungsgemäß mutagenisiert werden z. B. einzelne Untereinheiten oder Domänen dieser Proteine, bspw. der Kristalline, mit Beta-Faltblatt-Struktur.

Unter den Kristallinen ist besonders bevorzugt das Gamma-Kristallin zu nennen, von dem erfindungsgemäß beispielhaft gezeigt werden konnte, daß dessen Beta-Faltblatt-Struktur so abgeändert, d. h. mutagenisiert werden kann, daß neue spezifische Bindungseigenschaften oder neue katalytische Aktivitäten entstehen, die z. B. einem Antikörpermolekül vergleichbar sind. Ein Beispiel für ein Gamma-Kristallin ist das Gamma-II-Kristallin.

Beispiele für Beta-Helix-Proteine finden sich u. a. in Jenkins J. et al., J. Struct. Biol. 1998, 122 (1-2): 236-46; Pickering, R. et al., J. Biol. Chem. 1998, 273 (38), 24600-4 und Raetz C. R. et al., Science 1995, 270 (5238), 997-1000.

Die Beta-Faltblatt-Struktur ist dadurch definiert, daß sie im wesentlichen plattenförmig und fast völlig gestreckt vorliegt. Im Gegensatz zu alpha-Helices, die aus einem kontinuierlichen Teil der Polypeptidkette gebildet werden, können Beta-Faltblätter aus verschiedenen Regionen der Polypeptidkette aufgebaut sein. Dadurch können in der Primärstruktur weiter auseinanderliegende Bereiche in unmittelbare Nähe gelangen. Ein Beta-Strang ist normalerweise 5-10 Aminosäuren lang und liegt fast völlig gestreckt vor. Die Beta-Stränge liegen so eng beieinander, daß sich Wassersstoffbrücken zwischen der C=O-Gruppe des einen und der NH-Gruppe des anderen Strangs bzw. umgekehrt ausbilden. Beta-Faltblätter können aus mehreren Strängen aufgebaut sein und haben eine plattenförmige Struktur. Dabei liegt das C-alpha-Atom immer abwechselnd über oder unter der plattenförmigen Ebene. Die Seitenketten der Aminosäuren folgen diesem Muster und sind somit alternativ einmal nach oben und einmal nach unten gerichtet. Je nach Orientierung der Beta-Stränge unterscheidet man parallele und antiparallele Faltblätter. Erfindungsgemäß können beide mutagenisiert und zur Herstellung der beanspruchten Proteine eingesetzt werden.

Zur Mutagenese der Beta-Faltblatt-Struktur werden solche Beta-Faltblatt-Regionen im Protein ausgewählt, die oberflächennah sind. Oberflächenexponierte Aminosäuren können anhand der vorhandenen Röntgenkristallstruktur identifiziert werden. Liegt keine Kristallstruktur vor, so kann mittels Computeranalysen versucht werden, anhand der vorliegenden Primärstruktur oberflächenexponierte Beta-Faltblattbereiche und die Zugänglichkeit einzelner Aminosäurepositionen vorherzusagen (www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html) oder die 3d-Proteinstruktur zu modellieren (www.expasy.ch/swissmo/SWISS-MODEL.html) und damit Aussagen über möglicherweise oberflächenexponierte Aminosäuren zu gewinnen.

Es sind aber auch Mutagenesen im Beta-Faltblatt möglich, bei denen eine zeitaufwendige Vorauswahl der zu mutagenisierenden Aminosäurepositionen entfällt. Diejenigen DNA-Bereiche, die für die Beta-Faltblatt-Strukturen kodieren, werden aus ihrer DNA-Umgebung isoliert, einer zufallsgesteuerten Mutagenisierung unterzogen und anschließend wieder in die für das Protein kodierende DNA, aus der sie zuvor entnommen wurden, integriert. Hieran schließt sich ein Selektionsverfahren auf Mutanten mit den gewünschten Bindungseigenschaften und/oder katalytischen Eigenschaften an.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden, wie oben bereits ausgeführt, die oberflächennahen Beta-Faltblatt-Regionen ausgewählt und innerhalb dieser ausgewählten Regionen die zu mutagenisierenden Aminosäurepositionen identifiziert. Diese so ausgewählten Aminosäurepositionen können dann auf DNA-Ebene entweder zielgerichtet mutagenisiert werden, d. h. ein für eine bestimmte Aminosäure kodierendes Codon wird durch ein Codon ausgetauscht, das für eine andere, vorher ausgewählte spezifische Aminosäure kodiert, oder dieser Austausch erfolgt im Rahmen einer Random-Mutagenese, wobei die auszutauschende Aminosäureposition festgelegt ist, nicht dagegen das für die neue, noch unbestimmte Aminosäure kodierende Codon.

Oberflächenexponierte Aminosäuren sind dem umgebenden Lösungsmittel zugänglich. Bei einer Zugänglichkeit der Aminosäuren im Protein von mehr als 8% im Vergleich zur Zugänglichkeit der Aminosäure im Modelltripeptid Gly-X-Gly sprechen wir von oberflächenexponierten Aminosäuren. Diese Proteinbereiche bzw. einzelne Aminosäurepositionen sind auch bevorzugte Bindungsstellen für mögliche Bindungspartner, auf welche erfindungsgemäß selektiert werden soll. Bei den Bindungspartnern kann es sich beispielsweise um Antigene oder Substrate oder Substrat-Übergangszustandsanaloge handeln.

Erfindungsgemäß können praktisch alle Proteine mutagenisiert werden, die an der Oberfläche liegende, einem Lösungsmittel oder einem Bindungspartner zugängliche Beta-Faltblatt-Strukturen zeigen. Hierbei kommen vorwiegend solche Proteine in Betracht, die besonders stabil sind, d. h. z. B. gegen Denaturierung resistent sind oder ausreichend "klein" sind.

Unter "Mutagenisierung" ist erfindungsgemäß die Veränderung einer oder mehrerer oberflächenexponierter Aminosäuren in der Polypeptidkette mit Beta-Faltblatt-Struktur zu verstehen. Hierunter fallen beispielsweise Aminosäuresubstitutionen, wobei eine Aminosäure mit bestimmten Eigenschaften in Bezug auf ihre Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobizität oder Hydrophilizität durch eine Aminosäure mit einer anderen Eigenschaft ersetzt wird, beispielsweise also eine nicht polare hydrophobe Aminosäure durch eine polare Aminosäure, eine negativ geladene Aminosäure durch eine positiv geladene Aminosäure usw. Der Ausdruck "Mutagenisierung" umfaßt auch Insertionen und Deletionen. Voraussetzung ist dabei, daß die Mutationen oberflächenexponierte Aminosäuren in mindestens zwei oberflächenexponierten Beta-Strängen eines oberflächenexponierten Beta-Faltblatts umfassen. Die Mutationen werden gezielt an einzelnen Aminosäurepositionen im Beta-Faltblatt oder in ausgewählten Bereichen des Beta-Faltblatts gesetzt. Die Mutagenisierungen können in einem Bereich oder in mehreren Bereichen der Beta-Faltblatt-Struktur vorliegen. Die Veränderungen können benachbarte Aminosäuren oder weiter entfernt voneinander liegende Aminosäuren im Beta-Faltblatt umfassen.

In einer Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Mutagenese durch Assemblierung von DNA-Oligonukleotiden mit dem Aminosäure-Codon NNK. Selbstverständlich sind auch andere Codons (Tripletts) einsetzbar.

Die Mutationen sind so, daß die Beta-Faltblatt-Struktur erhalten bleibt. Generell findet die Mutagenese an der Außenseite eines stabilen, an der Oberfläche des Proteins exponierten Beta-Faltblatt-Bereiches statt. Sie umfaßt sowohl site-spezifische als auch zufallsgesteuerte Mutagenisierungen. Ortsspezifische Mutagenesen, die einen relativ kleinen Bereich in der Primärstruktur umfassen (ca. 3-5 Aminosäuren), können mit den kommerziell angebotenen Kits von Strata-

DE 199 32 688 A 1

gene (QuickChange) oder Bio-Rad (Muta-Gene phagemid in vitro mutagenesis kit) durchgeführt werden (vgl. US-A-5,789,166; US-A-4,873,192).

Bei größeren Bereichen einer ortsspezifischen Mutagenese muß eine DNA-Kassette hergestellt werden, wobei der zu mutagenisierende Bereich durch Assemblierung von Oligonukleotiden, die die mutierten und die nicht veränderten Positionen enthalten, erhalten wird (Nord et al., 1997; McConnell und Hoess, 1995). Zufallsgesteuerte Mutagenesen können durch Vermehrung der DNA in Mutator-Stämmen oder durch eine PCR-Amplifikation (errorprone-PCR) eingeführt werden (z. B. Pannekoek et al., 1993). Dabei wird eine Polymerase mit erhöhter Fehlerrate verwendet. Um den Grad der eingeführten Mutagenese zu erhöhen, bzw. unterschiedliche Mutationen zu kombinieren, können die Mutationen in den PCR-Fragmenten mittels DNA shuffling (Stemmer, 1994) kombiniert werden. Eine Übersicht über diese Mutagenese-strategien bei Enzymen bietet das Review von Kuchner und Arnold (1997). Um diese zufallsgesteuerte Mutagenese in einem ausgewählten DNA-Bereich durchzuführen, muß ebenfalls eine DNA-Kassette konstruiert werden, die für die Mutagenese genutzt wird.

Die im Mutageneseschritt erhaltenen DNA-Moleküle werden in einem geeigneten Expressionssystem exprimiert. Bevorzugt sind solche Expressionssysteme, die die nachfolgende Selektion und Isolierung von Mutanten mit den gewünschten Bindungseigenschaften und/oder der gewünschten katalytischen bzw. enzymatischen Aktivität erleichtern. Derartige Expressionsvektoren und Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt und wurden bereits vorstehend näher beschrieben. Es ist selbstverständlich möglich, auch andere Expressionssysteme einzusetzen, die die erfundungsge-mäß Selektion auf Mutanten mit spezifischen Eigenschaften bzw. Aktivitäten erlauben.

Bevorzugt wird zur Expression und Selektion das Phage-display-System eingesetzt, bei dem die Gesamtheit der auf DNA-Niveau erstellten Mutanten in ein Phagemid kloniert und auf der Oberfläche von Phagen exprimiert wird. Bei Proteinen mit reduzierten Cysteinen kann in einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsform der Erfindung zur Verbesserung der Exposition und Selektion der Mutanten GSH zugegeben werden.

Die Erfindung erfaßt die mutagenisierten Proteine, DNA-Moleküle, hiervon abgeleitete RNA-Moleküle und funktionelle Teile hiervon, welche für ein Protein mit einer mutagenisierten Beta-Faltblatt-Struktur kodieren, das zu einer neuen oder verbesserten Bindung an einen gewünschten Bindungspartner oder zu einer neuen oder verbesserten katalytischen Aktivität mit einem Substrat befähigt ist. Der Ausdruck "funktionelle Teile" bezieht sich auf Untereinheiten, Domänen, und Epitope des Proteins mit Beta-Faltblatt-Struktur, die erfundungsgemäß mutagenisiert wurden und die die gewünschten Bindungseigenschaften und Aktivitäten besitzen bzw. hierfür mitverantwortlich sind.

Die Selektion und Isolierung von Mutanten mit den gewünschten Bindungseigenschaften und/oder den gewünschten katalytischen Aktivitäten erfolgt in an sich bekannter Weise. Beispiele für Selektionsverfahren und Isolierungsverfahren auf Mutanten mit neuen bzw. verbesserten Bindungseigenschaften und neuen oder verbesserten katalytischen Aktivitäten sind nachfolgend beschrieben:

Bei der Selektion auf gewünschte Bindungseigenschaften werden die mutierten Proteine bzw. die funktionellen Teile hiervon mit ihren Bindungspartnern in Kontakt gebracht. Durch geeignete Nachweisverfahren werden Mutanten mit den gewünschten Bindungseigenschaften selektiert.

Bei der Selektion auf katalytische Aktivität werden die mutierten Proteine oder funktionelle Teile hiervon mit den Substraten in Verbindung gebracht und anschließend durch geeignete Nachweismethoden auf die gewünschte enzymati-sche Aktivität selektiert.

Eine Selektion auf katalytische Aktivität kann in mehreren Ansätzen erfolgen:

1. Phage Display:
Kopplung von Übergangszustandsanologa an eine Festphase und Selektion der Mutantenbank dagegen. Diese Substan-zen sind Analoga zu Übergangszuständen des Substrates, die normalerweise bei einem enzymatischen Umsatz eines Substrates zum Produkt entstehen (Substrat-Übergangszustandsprodukt). Dafür muß der Übergangszustand des Substrates allerdings aufgeklärt sein. Es ist auch möglich, ein Screening auf Bindung des Substrates durchzuführen.

2. ohne Phage Display:
Klonierung der Mutanten in ein bakterielles Expressionssystem und Ausplattieren der rekombinanten Bakterien zum Bildung von Einzelkolonien. Das mutierte Protein kann in den Bakterien durch Zugabe von Induktoren (z. B. IPTG) zum Nährmedium exprimiert werden. Das Nährmedium muß weiterhin das Substrat enthalten, auf dessen Umsatz gescreent werden soll. Das Substrat muß bei Umsatz ein identifizierbares, z. B. farbiges Produkt bilden. Die Bakterien, die eine Mutante exprimieren, die das Substrat im Nährmedium umsetzt, erhalten dadurch eine andere Farbe. Ein Beispiel wäre das Screening auf Beta-Galactosidase-Aktivität und der Umsatz von X-Gal (Blaufärbung) (Zhang et al., 1997).

3. Dem Fachmann sind auch weitere Nachweisverfahren bekannt:
Neben der Variante der Farbbildung könnten z. B. Proteinmutanten selektiert werden, die eine neue Resistenz vermitteln (Zugabe von Antibiotika zum Nährmedium) oder die ein Wachstum auf minimalen Nährmedien ermöglichen, auf denen das "normale" Bakterium nicht wächst. Hier kann der selektive Wachstumsvorteil der Bakterien mit der neuen Protein-mutante ausgenutzt werden (Crameri et al., 1997).

4. Expression und Sekretion der mutierten Proteine:
z. B. in Bakterien, Gewinnung der Überstände und Prüfung auf die gewünschte, zu selektierende enzymatische Aktivität (You und Arnold, 1996). Die vorliegende Erfindung löst somit das Problem der Schaffung von Proteinen mit neuen Bin-dungseigenschaften oder neuen katalytischen Eigenschaften dadurch, daß Proteine mit Beta-Faltblatt-Strukturen in die-sem Strukturmotiv mutagenisiert werden. Es wird auf solche Proteine selektiert, die die gewünschten neuen oder verbesserten Bindungseigenschaften oder die gewünschten neuen oder verbesserten enzymatischen bzw. katalytischen Aktivitäten besitzen. Durch das erfundungsgemäße System ist es sogar möglich, Beta-Faltblatt-Proteine, die keine Bindungsei-genschaften oder keine enzymatischen Eigenschaften besitzen, so zu verändern, daß sie nach Mutagenisierung im Beta-Faltblatt Bindungseigenschaften oder katalytische Eigenschaften erhalten.

Unter "Bindungseigenschaften" ist erfundungsgemäß beispielsweise die spezifische Affinität eines Antigens mit einem Antikörper zu verstehen. Nach der erfundungsgemäß durchgeföhrten Mutagenese besitzt das Beta-Faltblatt-Protein damit antikörperähnliche Eigenschaften und vereinigt in sich die Vorteile der hohen Bindungsspezifität eines Antikörpers mit

DE 199 32 688 A 1

den vorteilhaften Stabilitätseigenschaften eines Beta-Faltblatt-Proteins. Die erfundungsgemäß hergestellten Beta-Faltblatt-Proteine mit antikörperähnlichen Eigenschaften können auch eine katalytische Funktion besitzen.

Der erfundungsgemäß Lösungsvorschlag ermöglicht aber auch die Schaffung von Proteinen mit Beta-Faltblatt-Struktur mit neuen oder verbesserten katalytischen Aktivitäten. Auch die Verbesserung weiterer Proteineigenschaften, z. B. der fluoreszierenden Eigenschaften beim GFP, wäre möglich.

Erfundungsgemäß wird unter "Protein mit einer neuen spezifischen Eigenschaft" oder "mit einer neuen katalytischen Aktivität" ein Protein verstanden, welches vorher keine spezifische Bindungseigenschaft oder keine katalytische Aktivität besaß und durch die gezielte Mutagenisierung oberflächenexponierter Aminosäuren in mindestens zwei oberflächenexponierten Beta-Strängen eines oberflächenexponierten Beta-Faltblatts nunmehr eine spezifische Bindungseigenschaft oder eine katalytische Aktivität oder eine Kombination aus beiden besitzt. Hierunter fallen aber auch Proteine, die bereits vor der Mutagenisierung eine spezifische Bindungseigenschaft oder eine katalytische Aktivität aufwiesen und nach der Mutagenisierung im Beta-Faltblatt eine weitere, zusätzliche spezifische Bindungseigenschaft und/oder katalytische Aktivität besitzen. Es ist selbstverständlich auch möglich, daß ein Protein mit einer spezifischen Bindungseigenschaft nunmehr eine katalytische Aktivität aufweist oder umgekehrt.

Von der Erfahrung umfaßt werden weiterhin solche Proteine, die bereits eine spezifische Bindungseigenschaft und/oder eine enzymatische bzw. katalytische Aktivität besitzen und die nach der Mutagenisierung oberflächenexponierter Aminosäuren in mindestens zwei oberflächenexponierten Beta-Strängen eines oberflächenexponierten Beta-Faltblatts eine Verbesserung, allgemeiner ausgedrückt, eine Veränderung ihrer spezifischen Bindungseigenschaften und/oder ihrer katalytischen Aktivität erhalten.

Das erfundungsgemäß Verfahren und die hierdurch hergestellten Proteine unterscheiden sich auch insofern von Proteinen und Verfahren aus dem Stand der Technik, bei denen die Beta-Faltblatt-Struktur durch Random-Mutagenisierungen verändert wurden, die nicht gezielt auf die Beta-Faltblatt-Struktur ausgerichtet waren, sondern auf das gesamte Protein und insbesondere nicht zielgerichtet auf oberflächenexponierte Aminosäuren in mindestens zwei oberflächenexponierten Beta-Strängen eines oberflächenexponierten Beta-Faltblatts gerichtet waren oder derartige oberflächenexponierte Aminosäuren betrafen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfahrung, die nachfolgend beispielhaft beschrieben wird, wurde als ein Beispiel eines Proteins mit Beta-Faltblatt-Struktur das Gamma-Kristallin als Ausgangspunkt für die Mutagenese gewählt. Hierbei wurden zunächst durch Strukturuntersuchungen oberflächenexponierte Aminosäurepositionen ausgewählt und durch an sich bekannte Mutagenisierungsmethoden mutagenisiert. Die erhaltenen Mutanten wurden in einem geeigneten, ebenfalls bekannten Expressionssystem exprimiert. Die Selektion richtete sich auf solche Mutanten, deren oberflächenexponierte Aminosäuren im Beta-Faltblatt des Gamma-Kristallins eine spezifische Bindung an das Antigen BSA-Estradiol-17-Hemisuccinat zeigten. Es wurden zwar mehrere Mutanten mit der gewünschten Bindungseigenschaft isoliert, allerdings trägt nur eine die erwarteten Aminosäureaustausche. Es wurde damit ein antikörperähnliches, nicht Immunglobulin-Molekül erhalten, welches auf dem Ausgangsprotein Gamma-Kristallin basiert.

Durch das erfundungsgemäß Verfahren ist die Herstellung einer in der Tat riesigen Vielzahl von Mutanten möglich. Bereits die Mutagenese von acht Aminosäurepositionen ermöglicht die Bildung von $2,6 \times 10^{10}$ verschiedenen Proteinspezies, die auf die gewünschten Bindungseigenschaften und katalytischen Aktivitäten hin untersucht werden können.

Die erhaltenen mutierten Gene können in geeigneten Systemen vermehrt und die Proteine exprimiert werden. Geeignete Expressionssysteme sind prokaryontische oder eukaryontische Systeme. Die für das mutierte Protein kodierende DNA wird beispielsweise in einen geeigneten Vektor, beispielsweise in einen Expressionsvektor, überführt und durch Transformation, Transfektion oder Infektion in eine Wirtszelle eingebracht. Die Verbindung mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression der heterologen mutierten DNA gezielt steuern, ist selbstverständlich vorteilhaft.

Als Wirtszelle kann eine höhere Eukaryontenwirtszelle, beispielsweise eine Säugerzelle, oder eine niedere Eukaryontenwirtszelle, beispielsweise eine Hefezelle, oder eine Prokaryontenzelle, beispielsweise eine Bakterienzelle, eingesetzt werden. Ein Beispiel für eine mögliche bakterielle Wirtszelle ist *E. coli* oder *B. subtilis*. Auch zellfreie Translationssysteme zur Herstellung der Proteine unter Verwendung von RNA, die sich von der DNA der vorliegenden Erfahrung ableitet, ist möglich. Geeignete Klonierungs- und Expressionssysteme sind in verschiedenen Handbüchern zur Molekularen Biologie, Biotechnologie und Gentechnologie beschrieben. Beispiele hierfür sind Sambrook et al., 1989 und Ausubel et al., 1994.

Die vorstehend allgemein dargestellte Erfahrung wird nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels und der beiliegenden Zeichnungen näher erläutert. Das Beispiel ist als eine mögliche Form der Erfahrung zu verstehen, und die Erfahrung ist nicht auf diese besondere Ausgestaltung beschränkt.

Die beiliegenden Abbildungen zeigen:

Abb. 1: Oligonukleotide für die Assemblierung der Gamma-Kristallin-Mutanten.

Abb. 2: Schematische Darstellung der Oligonukleotidassembly und nachfolgender PCR an Streptavidin beladenen Magnetic Beads (MB). Die mit X gekennzeichneten Stellen markieren die randomisierten Aminosäurepositionen.

Abb. 3: Schematische Darstellung der Amplifizierung der nicht mutagenisierten Region des Gamma-II-Kristallins.

Abb. 4: Oligonukleotide für die Amplifizierung der nicht mutagenisierten Region des Gamma-II-Kristallins.

Abb. 5: Schematische Darstellung der pCANTAB 5E-Gamma-II-Kristallin-Expressionskassette. g3-SS: Signalpeptidsequenz des Phagenproteins G3; E-Tag: 11 Aminosäuren für den immunologischen Nachweis; fd Gen 3: minor coat Protein 3 des filamentösen Phagen M13.

Abb. 6: Polyclonaler Phagen-ELISA mit angereicherten Phagen nach dem 3. Panning. Die Mikrotiterplatten wurden entweder mit dem Konjugat BSA-Beta-Estradiol 17-Hemisuccinat oder als Kontrolle nur mit BSA beschichtet. Nebeneinander dargestellt ist die Bindung der Gamma-II-Kristallin-Wildtyp-Phagen (GC-WT), der Phagen aus der Ausgangsbank (GCUC-1) und der durch wiederholtes Panning angereicherten Phagen (E-17 Phagen) an das jeweilige Antigen.

Abb. 7: Partielle DNA-Sequenz der BSA-Estradiol-17-Hemisuccinat bindenden Gamma-II-Kristallin-Mutante 12A (Mu 12A) im Phagemid pGCKT 8-3 bzw. des Gamma-II-Kristallin Wildtyps (WT) in pCANTAB 5E. Kursiv und unterstrichen sind die eingeführten Schnittorte Sfi I (5') bzw. Bst EII (3') markiert. Fett gedruckt sind die Kodons der rando-

DE 199 32 688 A 1

misierten Aminosäurepositionen.

Abb. 8: Abgeleitete Aminosäuresequenzen der BSA-Estradiol-17-Hemisuccinat bindenden Gamma-II-Kristallin-Mutante 12A (Mu 12A) und des Gamma-II-Kristallin Wildtyps (WT) nach Expression in den Phagenidien und Abspaltung des Signalpeptides. Die randomisierten Aminosäurepositionen sind fett und tatsächlich ausgetauschte Aminosäuren fett und unterstrichen gekennzeichnet. Durch den Sfi I-Schnittort N-terminal zusätzlich eingeführten Aminosäuren und die C-terminale E-Tag-Fusion sind kursiv und unterstrichen dargestellt.

Abb. 9: Sequenz der für die Klonierung von Mu 12A und Gamma-II-Kristallin in den Vektor pET-20b verwendeten Primer.

Abb. 10: Abgeleitete Proteinsequenz der BSA-Estradiol-17 bindenden Mutante 12A und des Gamma-II-Kristallins nach Expression in pET-20b. Die randomisierten Aminosäurepositionen sind fett und tatsächlich ausgetauschte Aminosäuren fett und unterstrichen gekennzeichnet. Durch die Klonierung zusätzlich eingeführte C-terminale Aminosäuren einschließlich der 6 Histidinreste sind kursiv und unterstrichen dargestellt.

Abb. 11: Konzentrationsabhängige Bindung der Mutante 12A an das Konjugat BSA-Beta-Estradiol 17-Hemisuccinat. Untersucht wurde die Bindung der Mutante (12A) und des Gamma-II-Kristallins (WT) an das Konjugat (BSA-Est. 17) als Kontrolle an BSA.

Abb. 12: Stabilität der Mutante 12A gegenüber dem Denaturierungsmittel Guanidin. Dargestellt sind die Emissionsmaxima nach Inkubation der gereinigten Proteine der Mutante 12A und des Gamma-II-Kristallins mit verschiedenen Konzentrationen an Guanidin und nach verschiedenen Zeiten.

BEISPIEL

Herstellung einer Gamma-Kristallin-Mutante mit spezifischer Bindung an das Hormon Estradiol

Das Design von neuartigen Beta-Faltblatt-Proteinen mit Antigenbindungseigenschaften wird anhand der Isolierung einer Mutante des bovinen Gamma-B-Kristallins (Gamma-II), die spezifisch an das Hormon Estradiol bindet, gezeigt. Durch gezielte Veränderung von ausgewählten Aminosäurepositionen eines oberflächenexponierten Beta-Faltblattes wurde ein neuartiges, stabiles Protein mit Beta-Faltblattstruktur und spezifischen Bindungseigenschaften hergestellt. Nach Auswahl der für eine Mutagenese geeigneten Region bzw. Aminosäuren im Beta-Faltblatt erfolgt eine ortsspezifische Mutagenese auf DNA-Ebene, die Herstellung einer Beta-Faltblatt-Mutanten-Bank in einem Phagenid, welches die Expression und nachfolgende Selektion auf neuartige Bindungseigenschaften der Mutanten im Phage Display-System ermöglicht. Die isolierte Mutante wurde hinsichtlich ihrer neuen Eigenschaften mit dem Ausgangsprotein Gamma-II-Kristallin verglichen.

Auswahl einer geeigneten Region für die Mutagenese im Gamma-Kristallin

Basierend auf der Röntgenstruktur des Gamma-II-Kristallins (Wistow et al., 1983) wurde die N-terminale Domäne des Gamma-II-Kristallins (Acc. M16894) für eine Mutagenese ausgewählt. Insgesamt wurden dort acht Aminosäuren identifiziert, die ein zusammenhängendes Oberflächensegment ausbilden. Die ausgewählten Aminosäuren sind Bestandteil eines Beta-Faltblatts und sollten nicht maßgeblich zur Strukturerhaltung beitragen. Es handelt sich um Aminosäurepositionen, die dem Lösungsmittel und somit auch möglichen Bindungspartnern zugänglich sind. Die acht Aminosäuren Lys 2, Thr 4, Tyr 6, Cys 15, Glu 17, Ser 19, Arg 36 und Asp 38 umfassen eine Fläche von ca. 6.1% der Gesamtoberfläche des Proteins.

Herstellung eines DNA-Pools an mutierten Gamma-II-Kristallin-Genen

Durch eine ortsspezifische Mutagenese wurden die acht Aminosäurepositionen randomisiert. Damit können 2.6×10^{10} verschiedene Proteinspezies gebildet werden. Der zu mutagenisierende Bereich wurde auf DNA-Ebene durch Zusammenlagerung einzelner Oligonukleotide erhalten. Nachfolgend erfolgte die Klonierung in ein für die Selektion im Phage Display-System konstruiertes Phagenid.

Oligoassemblierung

Für die Mutagenese wurden 227 bp, die den 5'-Bereich der Gamma-Kristallin-Mutanten mit den acht randomisierten Aminosäurepositionen sowie geeignete Restriktionsschnittorte enthielten, an einer Festphase assembliert. Insgesamt wurden dafür 10 einzelne Oligonukleotide verwendet, wovon drei die randomisierten Aminosäurepositionen enthielten (Abb. 1). An den 8 zu mutagenisierenden Positionen wurde bei der Primersynthese das Nukleotidgemisch NN(T/G) eingesetzt, wodurch theoretisch an einer Position 32 verschiedene Kodons entstehen (vgl. Nord et al., 1997). Zu Beginn der Assemblierung wurden biotinierte Oligonukleotide an mit Streptavidin beladene Magnetic Beads (MBs) der Firma Dynal (M-280) angelagert. Nach mehreren Anlagerungs-, Ligations- und Polymeraseschritten konnte der an der Festphase assemblierte Pool an mutagenisierten Regionen des Gamma-Kristallins durch PCR amplifiziert werden (Abb. 2). Die ca. 250 bp langen PCR-Produkte enthielten 5' einen Sfi I- und 3' einen Bst EII-Schnittort.

Alle für die Assemblierung verwendeten Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt. Zuerst wurden die Primer GCLIE1B und GCLIE2P assembliert. Dafür wurden jeweils 4 μ l der Primer mit 36 μ l Wasch- und Bindungspuffer (WB-Puffer: 1M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) versetzt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach Vereinigung der beiden Primer und weiterer 5-minütiger Inkubation bei 70°C wurde das Primergemisch langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. 4 μ l des GCLIE1B/GCLIE2P-Primerhybrids wurden mit 56 μ l WB-Puffer vermischt und zu 300 μ g der Streptavidinbeladenen MBs, die zuvor mit Wasch- und Bindungspuffer gewaschen wurden, gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein Waschen der MBs mit WB- und TE-Puffer

DE 199 32 688 A 1

(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA). Zu den mit dem 1. Primerhybrid gekoppelten MBs wird ein Primer-Brückenfragment gegeben, welches wie folgt hergestellt wird: 4 µl des Primers GCLIB4P bzw. GCL15P werden mit 30 µl 1 × Ligationspuffer der Fa. GIBCO BRL (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DIT, 5% (v/v) Polyethylen glycol-8000) vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 70°C werden beide Ansätze vereinigt, weitere 5 min bei 70°C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu dem Gemisch werden 4 µl GCL13P und 16 µl 1 × Ligationspuffer, die zuvor wiederum für 5 min bei 70°C inkubiert wurden, gegeben. Nach Zugabe von 12 units T4-DNA-Ligase (Fa. GIBCO BRL) und 8 µl 1 × Ligationspuffer wird der Reaktionsansatz für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. 12 µl dieses GCLIE3P/GCLIE4P/GCL15P-Brückenfragments werden mit 54 µl 1 × Ligationspuffer sowie 6 units Ligase versetzt, zu den gewaschenen MBs, die das erste Primerhybrid enthalten, gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Ligationreaktion werden die MBs zweimal mit TE-Puffer gewaschen und in 64 µl 1 × Ligationspuffer mit 8 µl Ligase aufgenommen. Die MBs werden dann mit 8 µl des assemblierten Primergemisches GCL16P/GCLIB7P versetzt, deren Assemblierung zuvor analog der von GCLIB4P/GCL15P erfolgte. Die Ligation wurde wiederum für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einem zweimaligen Waschen der MBs in TE-Puffer werden 12 µl des 2. Brückenfragments GCLIB8P/GCLIE9P/GCLIE10 zugegeben und für 1 h ligiert. Die Herstellung 10 des 2. Brückenfragments erfolgt analog zum 1. Brückenfragment, wobei GCLIE9P und GCLIE10 zuerst assembliert und im zweiten Schritt mit GCLIE8P ligiert werden. Die MBs mit den immobilisierten Primern werden danach wiederum mit TE-Puffer gewaschen. Die nachfolgende DNA-Polymerase- und Ligasereaktion füllt die Lücken im Zweitstrang auf. Die MBs werden dafür für 30 min bei 37°C in dem folgenden Puffergemisch inkubiert: 52.5 µl H₂O, 6 µl Puffer I. Fa. Boehringer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythritol), 0.5 µl dNTP's (25 mM jedes dNTP) 15 und 1 µl 2 units Klenow-Fragment (Fa. Boehringer). Die Ligationreaktion schließt sich nach zweimaligen Waschen der MBs mit TE-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur an. In einem 100 µl-Ansatz befinden sich 10 units Ligase. Nach einem zweimaligen Waschschritt mit TE-Puffer wird der nicht kovalent an die MBs gebundene DNA-Strang durch Behandlung mit 40 µl 0.1 M NaOH für 30 s entfernt und die MBs in 60 µl TE resuspendiert. Die PCR zur Amplifizierung der Bank wird mit den MBs als Template durchgeführt. Die PCR-Reaktion (50 µl) wird wie folgt angesetzt: 6 µl MBs, 5 µl 10 × PCR-Reaktionspuffer der Fa. Stratagene (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8.75, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA), 1 µl (2.5 units) Pfui-DNA Polymerase (Fa. Stratagene), 0.5 µl dNTP's (25 mM jedes dNTP), 0.35 µl GCLIE1B, 0.35 µl GCLIA11B und 36.8 µl H₂O. Die PCR erfolgte in 35 Zyklen mit einem 20 Primer-Annealing bei 55°C für 1 min, einer Polymerasereaktion bei 72°C für 1.5 min, einer Denaturierung bei 95°C für 1 min und einer abschließenden Polymerase-Reaktion für 5 min bei 72°C.

30

Herstellung des Phagemids pGCKT 8-3

Ausgehend von dem Phagemid pCANTAB 5E (PRAS-Kit der Fa. Pharmacia Biotech) wurde ein Phagemid-Derivat für die Klonierung der Gamma-II-Kristallin-Mutanten-Bank konstruiert. Der gesamte 3'-Bereich des Gamma-II-Kristallins (C-terminale Domäne) und der nichtmutagenisierte 5'-Bereich wurden mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGII (Mayr et al., 1994) als Template und der Primer GDNORNOT und GCBACKSfI/Bst amplifiziert (Abb. 3, 4).

Die durch die Primer eingeführten Sfi I- (GCBACKSfI/Bst) bzw. Not I-Schnittorte (GDNORNOT) ermöglichen die Insertion des PCR-Produktes in das Phagemid pCANTAB 5E. Mit dem Primer GCBACKSfI/Bst wurde zusätzlich ein Bst EII-Schnittort in das Gamma-Kristallin-Gen integriert, der die Klonierung der mutierten Gamma-Kristallin-DNA-Fragmente erlaubt. Die de novo-Einführung des Schnittortes führt nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im Gamma-II-Kristallin. Das PCR-Produkt wurde nach Sequenzierung als Sfi I/Not I-Fragment in das Sfi I/Not I geschnitten Phagemid pCANTAB 5E kloniert. Das so konstruierte Phagemid pGCKT8-3 war Ausgangspunkt für die Herstellung der Gamma-II-Kristallin Phage Display-Bank.

45

Herstellung der Gamma-Kristallin-Mutanten-Bank und Klonierung des Wildtyp-Gamma-II-Kristallins

Das Phagemid pGCKT 8-3 wurde mit den Restriktionsenzyme Bst EII und Sfi I geschnitten und einer Phosphatasebehandlung unterzogen (shrimps Phosphatase, Fa. USB). Die DNA wurde nach den einzelnen Spaltungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, die gespaltenen Vektor-Fraktionen ausgeschnitten und mittels Elektroelution aus den Agarosegelen isoliert. Vor jeder weiteren enzymatischen Behandlung erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Fällung der DNA mit Glycogen. Der mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmentpool, der die mutierte Region des Gamma-II-Kristallins enthielt, wurde mit den Restriktionsenzyme Sfi I und Bst EII gespalten. Für die Ligation der PCR-Produkte in das vorbereitete Phagemid pGCKT 8-3 wurden insgesamt 440 ng Phagemid und 110 ng PCR-Produkt eingesetzt. Die Ligationsreaktionen erfolgten mit insgesamt 44 units T4-DNA-Ligase (Fa. GIBCO BRL) in 20 µl-Ansätzen bei 16°C über Nacht. Nach einer 20 minütigen Inaktivierung der Ligase bei 70°C wurden die Ligationsreaktionen für 1 h durch Tropfendialyse entsalzt. Jeweils 30 µl elektrokompetenter *E. coli*-TG 1-Zellen wurden mit je 15 µl der dialysierten Ligationen transformiert. Die Herstellung der elektrokompetenten Zellen und die Transformation erfolgten wie im Manual des PRAS-Kit beschrieben. Die transformierten Zellen wurden auf den Glukose- und Ampicillin-(100 µg/ml)-enthaltenden SOBAG-Platten (siehe Manual des PRAS-Kits, Fa. Pharmacia-Biotech) ausplattiert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Die hergestellte Bank GCUC-1 umfaßte 250.000 Originalklone. Die Klone wurden mit 2 × YT-Medium (siehe Manual der PRAS-Kits), welches 1% Glucose und 20% Glycerin enthielt, abgeschwemmt, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Amplifikationsfaktor der Bank wurde mit 7×10^6 bestimmt. Der Anteil an rekombinanten Klonen in der GCUC-1-Bank betrug 97%. Die Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone ergab, daß an den randomisierten Aminosäurepositionen Kodons mit der erwarteten Varianz eingesetzt wurden. Mittels Western-Blot-Analysen wurden in der Bank Expressionsraten von 30–60% nachgewiesen.

Für Kontrollexperimente wurde die Gamma-II-Kristallin-DNA wurde mit den Primern GDNORNOT (5' GAGT-CATTCTGCGGCCGCATAAAAATCCATCACCGTCTAAAGAAC 3') und GCBACKSfI (5' CATGCCAT-GACTCGGGCCCAGCCGGCCATGGGGAAAGAT CACTTTTACGAGGAC 3') und dem Plasmid pGII Mayr et al.,

DE 199 32 688 A 1

1994) als template amplifiziert. Das sequenzierte PCR-Produkt wurde nach Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen Not I und Sfi I in das ebenfalls Sfi I/Not I geschnittene Phagemid pCANTAB 5E kloniert.

Aufbau des Phage Displays und Selektion auf neuartige Bindungseigenschaften

Zur Selektion von Gamma-Kristallin-Mutanten auf Bindungseigenschaften wurde das kommerziell erhältliche Phage Display-System PRAS der Fa. Pharmacia-Biotech verwendet. In dem verwendeten Phagemiden pCANTAB 5E (Wildtyp-Gamma-II-Kristallin) und pGCKT 8-3 (Gamma-Kristallin-Mutanten) sind die Gamma-Kristalline N-terminal mit dem G3-Signalpeptid und C-terminal mit einem E-Tag, der den immunologischen Nachweis der Proteine ermöglicht, fusioniert (Abb. 5). In Abhängigkeit vom verwendeten Bakterienstamm wird das dem E-Tag folgende amber Stop-Kodon entweder erkannt (*E. coli*-HB 2151) und die Gamma-Kristalline werden nach Abspaltung des Signalpeptides ins Periplasma sekretiert oder überlesen (*E. coli* TG 1) und die Gamma-Kristalline werden als Fusion mit dem minor coat Protein des filamentösen Phagen M13 synthetisiert und nach Abspaltung des Signalpeptides in der inneren Plasmamembran der *E. coli*-Zelle verankert. Nach Zugabe eines Helperphagen können rekombinante Phagen gebildet werden, die auf ihrer Oberfläche die Gamma-II-Kristallin-Varianten exponieren.

Optimierung der Anzuchtbedingungen für die GCUC-1-Bank und die Gamma-II-Kristallin-Wildtyp-Phagen

Unter den im PRAS-Manual beschriebenen Anzuchtbedingungen wurden keine rekombinanten Phagen erhalten, bei denen mittels Western-Blot-Analysen die erwarteten Fusionsproteine (Gamma-II-Kristallin/Protein 3) nachgewiesen werden konnten. Erst durch Zugabe von reduziertem Glutathion (GSH) während der Phagenbildung wurde der Redoxzustand im Periplasma der Bakterienzelle verändert und somit günstigere Bedingungen für die Phagenassemblierung geschaffen. Bei Verwendung des Gamma-II-Kristallin-Klons konnten rekombinante, das Fusionsprotein tragende Phagen nur bei Zugabe von GSH nachgewiesen werden. Mit steigender GSH-Konzentration stieg auch der Anteil der Gamma-II-Kristallin-Phagen. Die optimale GSH-Konzentration wurde mit 8 mM bestimmt. Eine Ursache für die schlechte Expression des Gamma-Kristallins auf der Phagoberfläche ohne Zugabe von GSH könnte der hohe Anteil an reduzierten Cysteinen (7) im Gamma-Kristallin sein. Bei Eintritt des teilweise entfalteten Gamma-Kristallins in das Periplasma könnte es unter den dort vorherrschenden oxidativen Bedingungen zur Misfaltung und Aggregatbildung durch Disulfidbrückebildung kommen. Dadurch könnte auch die Phagenassemblierung unterdrückt werden. Bei Verwendung von Proteinen mit reduzierten Cysteinen im Phage Display System kann möglicherweise generell durch Zugabe von GSH die Bildung rekombinanter Phagen verbessert werden.

Selektionsprozeß mit der GCUCI-Phagen Display Bank

Für das Screening der GCUC-1-Bank wurde alle verwendeten Glasgeräte für 4 h bei 200°C und Plastik-Material mit Helipur für 1 h sterilisiert. Das Panning der GCUC-1-Bank erfolgte mit BSA-Beta-Estradiol 17-Hemisuccinat (Fa. Sigma) als Antigen. Für das Panning wurden Mikrotiterplatten (Maxisorp Fa. NUNC) als Festphase verwendet. Die Stringenz der Waschschritte wurde im Verlauf der 3 Panningrunden gesteigert. Für die erste Anzucht wurden 100 ml 2 × YT-Medium mit 2% Glukose und Ampicillin (100 µg/ml) mit 50 µl der GCUC-1 Bank inkuliert. Die Bakterien wuchsen bei 37°C und 300 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. In 10 ml dieser Bakterienkultur wurden 800 µl M13K07-Helperphage (1 × 10¹¹ pfu/ml, GTBCO BRL) gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min ohne und für weitere 30 min mit leichtem Schütteln (50 rpm). Das Bakterienpellet wurde durch Zentrifugation für 20 min, 1.500 rpm (Sorvall SS 34 Rotor) bei Raumtemperatur erhalten und in 100 ml 2 × YT-Medium mit 8 mM GSH, 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin aufgenommen. Die Bildung der rekombinanten Phagen erfolgte durch Übernacht-Kultivierung bei 30°C und 300 rpm. Der Überstand mit den rekombinanten Phagen wurde durch eine zweimalige 15-minütige Zentrifugation bei 10.800 g und eine anschließende Filtration (Porengröße 0,45 µm) erhalten. Die Konzentrierung der Phagen erfolgte durch Zugabe von 1/5 PEG/NaCl-Lösung (20% PEG-8000, 2,5 M NaCl) zum Überstand, einer einständigen Inkubation auf Eis, sowie zweimaliger 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und 3.300 g. Das erhaltene Phagenpellet wurde in 4 ml PBS pH 7,2 suspendiert und restliche Zellbestandteile durch eine Zentrifugation (10 min, 11.600 g, Raumtemperatur) abgetrennt. Für den Selektionsprozeß (Panning) wurde 1 ml der konzentrierten Phagen mit 1 ml einer 6%igen BSA-Lösung (6% BSA in PBS, pH 7,2) vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 100 µl der so behandelten Phagen wurden zu den wie folgt vorbereiteten, Antigen-beschichteten Mikrotiterplattenvertiefungen, gegeben. NUNC-Maxisorp-Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit dem Antigen BSA-Beta-Estradiol 17-Hemisuccinat beschichtet. Insgesamt wurden 10 Vertiefungen mit je 100 µl der Antigenlösung (100 µg/ml in PBS pH 7,6) versetzt. Die über Nacht bei Raumtemperatur beschichteten Vertiefungen wurden dreimal mit PBS, pH 7,6 gewaschen. Das Absättigen freier Bindungsstellen erfolgte durch Füllung der Vertiefungen mit einer 3%igen BSA/PBS, pH 7,2-Lösung für 2 h bei Raumtemperatur. Vor Zugabe der BSA-behandelten Phagen wurden die Vertiefungen zweimal mit einer PBS-Lösung (pH 7,2) gewaschen. Das Panning erfolgte durch 30-minütiges leichtes Bewegen der Mikrotiterplatte (20 rpm) und eine nachfolgende 90-minütige Inkubation ohne Schütteln bei Raumtemperatur. Unspezifisch gebundene Phagen wurden durch 10-maliges Waschen mit PBS, pH 7,2/0,1% Tween-20 und 10 maliges Waschen mit PBS, pH 7,2 entfernt. Bindende Phagen wurden durch Zugabe und 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur von jeweils 100 µl 100 mM Triethylamin (frisch hergestellt) pro Vertiefung eluiert. Eine Neutralisierung der basisch eluierten Phagen (1 ml) erfolgte durch Zugabe von 500 µl 1 M Tris-HCl pH 7,4. 750 µl dieser Phagen wurden für die Infektion von 9 ml, auf Minimalmedium-Platten angezogenen TG-1-Zellen mit einer OD₆₀₀ von 0,4–0,5 verwendet. Dafür wurden die Bakterien mit den Phagen für 30 min bei 37°C inkubiert. Besonders starke Binder, die durch die Triethylamin-Behandlung nicht von der Mikrotiterplatte entfernt wurden, konnten durch direkte Infektion von TG-1-Zellen gesichert werden. Dafür wurden jeweils 100 µl der angezogenen TG-1-Zellen zu den Vertiefungen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die infizierten TG-1-Zellen abgenommen und mit denen der Infektion mit den eluierten Phagen vereinigt. Die in-

DE 199 32 688 A 1

fizierten Bakterien wurden auf 16×16 cm-SOBAG-Platten ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Jeweils $1 \mu\text{l}$ der konzentrierten und eluierten Phagen wurde für die Titer-Bestimmung verwendet. Die erhaltenen Bakterienklone wurden mit $12,5 \text{ ml } 2 \times \text{YT}, 20\%$ Glycerin von den SOBAG-Platten abgeschwemmt. Das 2. und 3. Panning erfolgte analog zum ersten mit den folgenden Änderungen. Die erneute Phagenanzucht erfolgte mit $20 \mu\text{l}$ der abgeschwemmten Bank in 5 20 ml Medium. 2 ml der angezogenen Bakterienkultur wurden für die Infektion mit dem Helferphagen verwendet (Verhältnis Bakterien/Phagen: 1/20). Das Waschen der Mikrotiterplatten erfolgte beim 2. Panning zuerst 15 mal mit PBS/Tween-20 und dann 10-mal mit PBS und beim 3. Panning zuerst 20-mal mit PBS/Tween-20 und dann 10-mal mit PBS.

ELISA zur Überprüfung der Anreicherung und spezifischen Bindung

10 Der Nachweis der Anreicherung spezifisch bindender Phagen an das Antigen erfolgte mit einem polyklonalen Phagen-ELISA. Neben den eluierten Phagen wurden Phagen der Ausgangsbank GCUC-1 und des Wildtyp-Gamma-II-Kristallins als Vergleich getestet. NUNC-Maxisorp-Platten wurden mit $100 \mu\text{l}$ BSA-Estradiol-17-Hemisuccinat oder BSA in einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ PBS pH 7,6 über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Nach 3 maligem Waschen der Vertiefungen mit PBS, pH 7,6 erfolgte ein Blocking für 2 h bei 37°C mit 3% Trockenmilchpulver (Glücksklee)/PBS, pH 7,2 und nochmaliges (3 x) Waschen mit PBS, pH 7,6. Die nach der Phagenanzucht isolierten, nicht konzentrierten, rekombinanten Phagen wurden zunächst für 1 h bei Raumtemperatur geblockt (1 : 1 Mischen mit 6%igem Trockenmilchpulver (Marvel) / PBS pH 7,6. $100 \mu\text{l}$ der geblockten Phagen wurden pro Vertiefung aufgetragen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem jeweils 3-maligen Waschen der Vertiefungen mit PBS/Tween-20 und PBS erfolgte eine Inkubation mit dem 15 anti-M13-Antikörper-POD-Konjugat (Fa. Pharmacia-Biotech, Verdünnung 1 : 5000 in 3% Glücksklee/PBS) für 1 h bei 37°C . Nach Waschen der Platten erfolgte der Nachweis des enzymgebundenen Antikörpers mit $100 \mu\text{l}$ Immuno-Pure-TMB-Substrat (Fa. Pierce). Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ 2M H_2SO_4 abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Das Ergebnis der Anreicherung von Phagen nach dem 3. Panning, die an das BSA-Estradiol-Konjugat binden, ist in Abb. 6 dargestellt.

Isolierung und Charakterisierung von Einzelphagen mit spezifischer Bindung an das Konjugat

20 Von den nach dem 3. Panning erhaltenen Bakterienklonen wurden 80 Einzelklone ausgewählt. Von den Klonen wurden Phagen isoliert und im monoklonalen Phagen-ELISA hinsichtlich ihrer Antigenbindung einzeln getestet. Die Anzucht von einzelnen Bakterienklonen erfolgte in $100 \mu\text{l}$ $2 \times \text{YT}$ -Medium mit 2% Glukose und $100 \mu\text{g/ml}$ Ampicillin über 25 Nacht bei leichtem Schütteln (100 rpm) in Polypropylen-Mikrotiterplatten (Fa. NUNC). $2 \mu\text{l}$ dieser Bakterienkulturen wurden 1 : 100 in dem gleichen Medium verdünnt und bei 100 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,4 bei 37°C kultiviert. Phagen wurden, wie für den Selektionsprozeß beschrieben, erhalten. Für die Phagenanzucht wurden deep well Polypropylen-Mikrotiterplatten der Fa. TECAN verwendet. Für den ELISA wurden $200 \mu\text{l}$ des nach Zentrifugation erhaltenen Phagenüberstandes (nicht konzentriert) mit $40 \mu\text{l}$ 6×PBS/18% Marvel für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Von den 80 getesteten Klonen zeigten 30 eine deutliche Bindung der rekombinanten Phagen an BSA-Estradiol-17 und nicht an das parallel getestete BSA. Phagen mit dem Wildtyp-Gamma-II-Kristallin zeigte in einem Kontrollexperiment keinerlei Bindung an BSA-Estradiol-17. 14 ausgewählte Binder wurden mit den IRD 800 markierten Primern pCANRII.AB ($5'$ CCATGATTACGCC-AAGCTTTGGAGCC $3'$) und GCLISEQ ($5'$ CTGAAAGTCCGGTGTGTTGC $3'$) sequenziert. 35 Die Sequenzierung ergab nur in einem Fall eine Gamma-Kristallin-Variante (Mu 12A), die ausschließlich in den acht randomisierten Aminosäurepositionen mutiert war. Eine Reihe von Klonen zeigte Verschiebungen im Leserahmen, die zwar theoretisch für ein funktionelles Protein, allerdings nicht ausschließlich Veränderungen in der erwarteten Region des Gamma-Kristallins aufwiesen. Diese frame shift-Mutanten wurden nicht weiter verfolgt.

Charakterisierung der Beta-Faltblatt-Mutante 12A

40 Die Expression des Fusionsproteins Mu 12A-minor coat Protein 3 auf der Oberfläche der rekombinanten Phagen sowie die Expression von Mu 12A in dem E. coli-Stamm HB 2151 wurde mittels Western-Blot-Analysen unter Verwendung des Anti-G3P- bzw. des Anti-E-Tag-Antikörpers (Fa. Pharmacia-Biotech) nachgewiesen. Die DNA-Sequenz der 45 Mutante 12A im Phagemid pGCKT 8-3 und des Gamma-II-Kristallin-Wildtyps ist in Abb. 7 dargestellt. Die DNA-Sequenz beginnt mit dem Sfi I-Schnittort, der bereits im Ausgangsphagemid pCANTAB 5E vorhanden ist, und endet im Falle von pGCKT 8-3 mit dem in das Gamma-II-Kristallingen neu eingeführten Bst EII-Ort bzw. der ursprünglichen Sequenz im Falle des Gamma-II-Kristallin-Wildtyps. In Abb. 8 sind die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen dargestellt. Die Kodon-Randomisierung in Aminosäureposition 36 führt nicht zu einer Veränderung der Aminosäure Arginin in dieser Position. Die Computer-Modellierung der Mutante 12A zeigt, daß die Aminosäureaustausche nicht zu großen Veränderungen in der Proteinstruktur im Vergleich zum Ausgangsprotein führen. Allerdings kommt es zu einer positiven Verschiebung der Nettoladung:

Expression von Mu 12A in pET 20b

50 Für eine ausführliche Charakterisierung der Mutante 12A erfolgte eine Umklonierung der DNA in das Plasmid pET-20b (Fa. Novagen). Das Plasmid ermöglicht eine hohe Expression der rekombinanten DNA in dem E. coli-Stamm BL 21 sowie eine leichte Reinigung der Fremdproteine. Gene werden hier ohne Signalpeptid mit einer C-terminalen Fusion von 55 6 Histidinresten exprimiert. Die DNA der Mutante 12A und des Gamma-II-Kristallin-Wildtyps wurden mittels PCR unter Verwendung der entsprechenden Phagemid-DNA und der Primer GC 20bbback12A/GC für 20b für die Mutante 12A und GC 20bbbackWT/GC für 20b für den Wildtyp amplifiziert (Abb. 9). Die PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen Nde I und Barn HI gespalten und in den Nde I/Bam HI geschnittenen Vektor pET 20b kloniert. Die theoretische Aminosäuresequenz der Mutante 12A bzw. des Gamma-II-Kristallins nach Expression in pET-20b in Abb.

DE 199 32 688 A 1

10 dargestellt. Die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren der Mutante 12A wurde durch N-terminale Proteinsequenzierung bestätigt.

Anzucht und Reinigung der Mutante und des Wildtyps in pET 20b

Für genaue Untersuchungen der Bindungseigenschaften und der Stabilität der Mutante wurden große Mengen an Proteinen der Mutante 12A und des Wildtyps hergestellt. BL 21-Zellen wurden mit den Plasmiden pET-20bIMu 12A bzw. pET-20bbGamma-II-Kristallin transformiert. Für die Anzucht der Klone wurde eine Vorkultur 1 : 100 mit LB-Medium/100 µg/ml Ampicillin verdünnt und die Kultur bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 200 rpm geschüttelt. Die Expression der Gamma-Kristalline wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Die weitere Kultivierung erfolgte über Nacht bei 30°C und 200 rpm. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C, 6.000 rpm (Sorvall GS3 Rotor) für 10 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 30 ml 2 × PBS unter Zugabe von 150 µl 200 mM PMSF und 10 µl DNase (Fa. Boehringer) suspendiert. Es erfolgte ein zweimaliger Zellaufschluss mit der Gaulinpresse bei 800–1000 PSIG. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde nach Zentrifugation der Zellsuspension für 1 h bei 4°C und 20.000 rpm (Sorvall SS 34 Rotor) erhalten. Die Reinigung der mit 6 Histidinresten fusionierten Gamma-Kristalline erfolgte über Affinitätschromatographie bei 4°C. 8 ml Ni-NTA wurden mit 50 ml 2 × PBS/10 mM Imidazol equilibriert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde dann im Batch-Versfahren mit dem equilibrierten Säulenmaterial über Nacht auf einem Rollenschüttler langsam bewegt. Nach Umlöten der Suspension in eine Chromatographiesäule erfolgte ein Waschen mit 2 × PBS/10 mM Imidazol/300 mM NaCl. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit 2 × PBS/250 mM Imidazol. Dem eluierten Proteinen wurde DTT (Endkonzentration 10 mM) zugesetzt. Anschließend erfolgten 2 Dialyseschritte bei 4°C für jeweils 8 h: 1. mit 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 6.0/1 mM EDTA/1 mM DTT und 2. mit 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6.0/1 mM EDTA. Der nach einer abschließenden Zentrifugation (4°C, 30 min, 20.000 rpm mit Sorvall SS 34 Rotor) erhaltene Überstand enthielt das gereinigte Protein (Mu 12A bzw. Gamma-II-Kristallin), das für Bindungs- und Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt wurde.

Für die Testung der spezifischen Bindung der Mutante 12A an das Konjugat BSA-Estradiol-17-Hemisuccinat wurde ein ELISA durchgeführt, wobei steigende Konzentrationen an gereinigtem Protein der Mutante 12A-His-Tag eingesetzt wurden. Als Kontrolle wurden steigende Mengen an Gamma-II-Kristallin-Wildtyp (ebenfalls mit His-Tag) eingesetzt sowie die Bindung beider gereinigter Proteine an BSA getestet. Der konzentrationsabhängige ELISA wurde mit NUNC-Tm-Platten durchgeführt. Die Antigen-Beschichtung mit dem BSA-Estradiol-17-Hemisuccinat-Konjugat bzw. dem BSA erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Beschichtung erfolgte mit jeweils 100 µl Antigen in einer Konzentration von 20 µg/ml PBS pH 7.6. Nach Waschen (2 × PBS pH 7.6) und Blocken der Platten (3% Marvel/PBS für 2 h bei 37°C) wurden jeweils 1–13 µl der Proteinstammlösung (Konzentration 0,63 mg/ml) an gereinigtem Mu 12A bzw. Gamma-II-Kristallin in insgesamt 100 µl Reaktionslösung (PBS, 3% Marvel, x µl Protein) gegeben und für 2 h bei 37°C in den Vertiefungen inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden der Tetra His Antikörper der Fa. Qiagen in einer Verdünnung von 1 : 3000 und der Anti-Maus-POD-Antikörper (Fa. Sigma) in einer Verdünnung von 1 : 2000 eingesetzt. Die Antikörper wurden mit einer 3%igen Marvel/PBS-Lösung verdünnt, 100 µl zu den Vertiefungen gegeben und für jeweils 1 h bei 37°C inkubiert. Die Substrataktion erfolgte wie für den polyklonalen Phagen-ELISA beschrieben. Das Ergebnis dieses ELISA in Abb. 11 zeigt deutlich, daß nur mit steigenden Konzentrationen der Mutante 12A steigende Extinktionen gemessen werden. Keinerlei Anstieg wurde mit dem Gamma-II-Kristallin festgestellt. Ebenfalls wurde keine Reaktion mit BSA beobachtet. Damit ist die spezifische Bindung der Mutante 12A im Vergleich zum Ausgangsprotein gezeigt.

Für die Untersuchungen zur Stabilität wurden Guanidin-Denaturierungskurven der Mutante 12A sowie des Gamma-II-Kristallins aufgenommen. Dazu wurden die gereinigten Proteine in einer Endkonzentration von 20 µg/ml mit steigenden Konzentrationen an Guanidinium für einen und für drei Tage bei 20°C inkubiert. Insgesamt wurden 15 Guanidiniumkonzentrationen im Bereich von 0–5, 5 M in einer 1 mM DTT/0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,0-Lösung eingestellt. Von jedem Ansatz wurde nach einem bzw. drei Tagen ein Fluoreszenz-Emissions-Spektrum von 300–400 nm aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. In Abb. 12 sind die festgestellten Emissionsmaxima gegen die Guanidiniumkonzentrationen abgetragen. Die Stabilität des Gamma-II-Kristallins ist sowohl bei einem als auch bei drei Tagen höher als die der Mutante 12A. Im Vergleich zu Antikörpermolekülen weist die Mutante 12A jedoch eine viel höhere Stabilität auf.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 199 32 688 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Fiedler, Dr. Ulrike
 Rudolph, Prof. Dr. Rainer

10 <120> Design von Beta-Faltblatt-Proteinen mit spezifischen
 Bindungseigenschaften

15 <130> P11312

20 <140>
15 <141>

25 <160> 22

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

30 <210> 1
25 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

35 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:Oligonukleotid

40 <400> 1
 cgcgcgctc tcacaaagat acatgccatg actcgccggcc cagcc 45

45 <210> 2
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

50 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:Oligonukleotid

55 <400> 2
 gccgcaggaa gtactggta ccctggtagt tggggcgctc atacagcatc 50

60 <210> 3
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

65 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen

DE 199 32 688 A 1

<400> 3
ccatcagccc catcagcgaa ctttgccgca ggaagtactg g 41 5

<210> 4
<211> 48
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid 15

<400> 4
gagtcattct gcggccgcatttccat caccgtctt aaagaacc 48 20

<210> 5
<211> 59
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz 25

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid 30

<400> 5
gcggcccgccaggc cggccgcgtgc tggatgttgtt atgagcgccc caactaccagg ggtcaccagg 59 35

<210> 6
<211> 55
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz 45

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid 50

<400> 6
catgccatga ctcgcggccc agccggccat gggaaagatc acttttacg aggac 55 55

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz 60

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen 65

DE 199 32 688 A 1

DE 199 32 688 A 1

<210> 12
<211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 12
ggccatgggg nnkatchnnkt ttnnkgagga ccgggg 36 18

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 13
gtggccctgg aagccccggc cctc 24 30

<210> 14
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 14
cttccagggc cacnnktacn nktgcnnkag cgactgcccc aacc 44 45 50

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 15
tgcagcccta tttcagccgc 20 60 65

DE 199 32 688 A 1

```

5 <210> 16
<211> 47
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen
      Sequenz:Oligonukleotid

15 <400> 16
gatggaggtta cagcggctga aataggggctg caggttgggg cagtcgc 47

20 <210> 17
<211> 45
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen
      Sequenz:Oligonukleotid

30 <400> 17
tgtaactcca tcnnkgtgnn kagcggctgc tggatgctgt atgag 45

35 <210> 18
<211> 37
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen
      Sequenz:Oligonukleotid

45 <400> 18
cgccccaaact accagggtca ccagtacttc ctgcggc 37

50 <210> 19
<211> 198
<212> PRT
<213> Bos sp.

55 <400> 19
Ala Ala Gln Pro Ala Met Gly Arg Ile Lys Phe Lys Glu Asp Arg Gly
      1           5           10          15

60 <210> 19
Ala Ala Gln Pro Ala Met Gly Arg Ile Lys Phe Lys Glu Asp Arg Gly
      1           5           10          15

65 Phe Gln Gly His Tyr Tyr Ser Cys Asn Ser Asp Cys Pro Asn Leu Gln
      20          25          30

```

DE 199 32 688 A 1

Pro Tyr Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Arg Val Leu Ser Gly Cys Trp
 35 40 45

Met Leu Tyr Glu Arg Pro Asn Tyr Gln Gly His Gln Tyr Phe Leu Arg
 50 55 60

Arg Gly Asp Tyr Pro Asp Tyr Gln Gln Trp Met Gly Phe Asn Asp Ser
 65 70 75 80

Ile Arg Ser Cys Arg Leu Ile Pro Gln His Thr Gly Thr Phe Arg Met
 85 90 95

Arg Ile Tyr Glu Arg Asp Asp Phe Arg Gly Gln Met Ser Glu Ile Thr
 100 105 110

Asp Asp Cys Pro Ser Leu Gln Asp Arg Phe His Leu Thr Glu Val His
 115 120 125

Ser Leu Asn Val Leu Glu Gly Ser Trp Val Leu Tyr Glu Met Pro Ser
 130 135 140

Tyr Arg Gly Arg Gln Tyr Leu Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Tyr
 145 150 155 160

Leu Asp Trp Gly Ala Met Asn Ala Lys Val Gly Ser Leu Arg Arg Val
 165 170 175

Met Asp Phe Tyr Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro
 180 185 190

Leu Glu Pro Arg Ala Ala
 195

<210> 20

50

<211> 198

<212> PRT

<213> Bos sp.

<400> 20

55

Ala Ala Gln Pro Ala Met Gly Lys Ile Thr Phe Tyr Glu Asp Arg Gly
 1 5 10 15

60

Phe Gln Gly His Cys Tyr Glu Cys Ser Ser Asp Cys Pro Asn Leu Gln
 20 25 30

Pro Tyr Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Arg Val Asp Ser Gly Cys Trp

65

DE 199 32 688 A 1

35 40 45
Met Leu Tyr Glu Arg Pro Asn Tyr Gln Gly His Gln Tyr Phe Leu Arg
5 50 55 60

Arg Gly Asp Tyr Pro Asp Tyr Gln Gln Trp Met Gly Phe Asn Asp Ser
10 65 70 75 80

Ile Arg Ser Cys Arg Leu Ile Pro Gln His Thr Gly Thr Phe Arg Met
15 85 90 95

Arg Ile Tyr Glu Arg Asp Asp Phe Arg Gly Gln Met Ser Glu Ile Thr
20 100 105 110

Asp Asp Cys Pro Ser Leu Gln Asp Arg Phe His Leu Thr Glu Val His
25 115 120 125

Ser Leu Asn Val Leu Glu Gly Ser Trp Val Leu Tyr Glu Met Pro Ser
30 130 135 140

Tyr Arg Gly Arg Gln Tyr Leu Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Tyr
35 145 150 155 160

Leu Asp Trp Gly Ala Met Asn Ala Lys Val Gly Ser Leu Arg Arg Val
40 165 170 175

Met Asp Phe Tyr Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro
45 180 185 190

Leu Glu Pro Arg Ala Ala
50 195

<210> 21
55 <211> 197
<212> PRT
<213> Bos sp.

<400> 21
55 Met Gly Arg Ile Lys Phe Lys Glu Asp Arg Gly Phe Gln Gly His Tyr
1 5 10 15

60 Tyr Ser Cys Asn Ser Asp Cys Pro Asn Leu Gln Pro Tyr Phe Ser Arg
20 25 30

65 Cys Asn Ser Ile Arg Val Leu Ser Gly Cys Trp Met Leu Tyr Glu Arg
35 40 45

DE 199 32 688 A 1

Pro Asn Tyr Gln Gly His Gln Tyr Phe Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Pro				
50	55	60		5
Asp Tyr Gln Gln Trp Met Gly Phe Asn Asp Ser Ile Arg Ser Cys Arg				
65	70	75	80	
Leu Ile Pro Gln His Thr Gly Thr Phe Arg Met Arg Ile Tyr Glu Arg				10
85	90	95		
Asp Asp Phe Arg Gly Gln Met Ser Glu Ile Thr Asp Asp Cys Pro Ser				15
100	105	110		
Leu Gln Asp Arg Phe His Leu Thr Glu Val His Ser Leu Asn Val Leu				
115	120	125		20
Glu Gly Ser Trp Val Leu Tyr Glu Met Pro Ser Tyr Arg Gly Arg Gln				
130	135	140		25
Tyr Leu Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Tyr Leu Asp Trp Gly Ala				
145	150	155	160	
Met Asn Ala Lys Val Gly Ser Leu Arg Arg Val Met Asp Phe Tyr Ser				30
165	170	175		
Asp Pro Asn Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His				35
180	185	190		
His His His His His				40
195				
<210> 22				45
<211> 197				
<212> PRT				
<213> Bos sp.				50
<400> 22				
Met Gly Lys Ile Thr Phe Tyr Glu Asp Arg Gly Phe Gln Gly His Cys				
1	5	10	15	55
Tyr Glu Cys Ser Ser Asp Cys Pro Asn Leu Gln Pro Tyr Phe Ser Arg				
20	25	30		60
Cys Asn Ser Ile Arg Val Asp Ser Gly Cys Trp Met Leu Tyr Glu Arg				
35	40	45		
Pro Asn Tyr Gln Gly His Gln Tyr Phe Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Pro				65

DE 199 32 688 A 1

	50	55	60
	Asp Tyr Gln Gln Trp Met Gly Phe Asn Asp Ser Ile Arg Ser Cys Arg		
5	65	70	75
	Leu Ile Pro Gln His Thr Gly Thr Phe Arg Met Arg Ile Tyr Glu Arg		
	85	90	95
10			
	Asp Asp Phe Arg Gly Gln Met Ser Glu Ile Thr Asp Asp Cys Pro Ser		
	100	105	110
15	Leu Gln Asp Arg Phe His Leu Thr Glu Val His Ser Leu Asn Val Leu		
	115	120	125
20	Glu Gly Ser Trp Val Leu Tyr Glu Met Pro Ser Tyr Arg Gly Arg Gln		
	130	135	140
25	Tyr Leu Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Tyr Leu Asp Trp Gly Ala		
	145	150	155
	Met Asn Ala Lys Val Gly Ser Leu Arg Arg Val Met Asp Phe Tyr Ser		
	165	170	175
30	Asp Pro Asn Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His		
	180	185	190
35	His His His His		
	195		

40

Zitierte Literatur

- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S.-M., Lee, T., Pope, H. S., Riordan, G. S. and Whitlow, M. (1988): Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423–426.
- Brinkmann, U., di Carlo A., Vasmatzis, G., Kurochkin, N., Beers, R., Byungkook, L. and Pastan, I. (1997): Stabilization of a recombinant Fv fragment by base-100p interconnection and VH-VL permutation. *J. Mol. Biol.* 268, 107–117.
- Choo, Y. and Klug, A. (1995): Designing DNA-binding proteins on the surface of filamentous phage. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 431–436.
- Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B. J., Choudhury, A. and Batra, S. K. (1998): Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q. J. Nucl. Med.* 42, 225–241.
- Cortese R., Monaci, P., Luzzago, A., Santini, C., Bartoli, F., Cortese, I., Fortugno, P., Galfre, G., Nicosia, A. and Felici, F. (1995): Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr Opin. Biotechnol.* 6, 73–80.
- Cumber, J. A., Ward, E. S., Winter, G., Parnell, G. D. and Wawrzynczak, E. J. (1992): Comparative stabilities in vitro and in vivo of a recombinant mouse antibody FvCys fragment and a bisFvCys conjugate. *J. of Immunology* 149, 120–126.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger I. and Plückthun, A. (1990): A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29, 1362–1367.
- Haaparanta T. and Huse W. D. (1995): A combinatorial method for constructing libraries of long peptides displayed by filamentous phage. *Mol. Diversity* 1, 39–52.
- Hanes, J. et al. (1997): In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4937–42.
- Hazes, B. and Hol, W. G. J. (1992): Comparison of the hemocyanin- β -barrel with other greek key β -barrels: possible importance of the "β-zipper" in protein structure and folding. *Proteins: Struct., Funct. Gen.* 12, 278–298.
- Hemmingsen, J. M., Gernert, K. M., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (1994): The tyrosine corner: a feature of most greek key β -barrel proteins. *Prot. Science* 3, 1927–1937.
- Holliger, H. and Winter G. (1993): Engineering bispecific antibodies. *Curr. Opin. Biotech.* 4, 446–449.
- de Kruijff, J., Boel, E. and Logtenberg, T. (1995): Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J. Mol. Biol.* 248, 97–105.
- Ku, J. and Schultz, P. G. (1995): Alternate protein frameworks for molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92,

DE 199 32 688 A 1

- 6552-6556.
- Mayr, E.-M., Jaenicke, R. and Glockshuber, R. (1994): Domain interactions and connecting peptides in lens crystallins. *J. Mol. Biol.* 235, 84-88.
- Mandal, K., Chakrabart, B., Thomson, J. and Siezen, R. J. (1987): Structure and stability of β -crystallins. Denaturation and proteolysis behaviour. *J. Biol. Chem.* 262, 8096-8102.
- McConell S. and Hoess R. H. (1995): Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries. *J. Mol. Biol.* 250, 460-470.
- McConnell, S. J., Uveges, A. J., Fowlkes, D. M. and Spinella, D. G (1996): Construction and screening of M13 phage libraries displaying long random peptides. *Mol. Diversity* 1, 165-176.
- Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lanc, D. and Winter, G. (1992): Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* 13, 692-698.
- Nord K., Gunnarsson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. and Nygren, P. A. (1997): Binding proteins selected from combinatorial libraries of an β -helical bacterial receptor domain. *Nat. Biotechnol.* 8, 772-777.
- Pack, P. and Plückthun, A. (1992): Minianibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in Escherichia coli. *Biochemistry* 31, 1579-1584.
- Pantoliano, M. W., Bird, R. E., Johnson, S., Asel, E. D., Dodd, S. W., Wood, J. F. and Hardman, K. D. (1991): Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of singlechain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli. *Biochemistry* 30, 10117-10125.
- Richardson, J. S., Richardson, D. C., Tweedy, N. B., Gernert, K. M., Quinn, T. P., Hecht, M. H., Erickson, B. W., Yan, Y., McClain, R. D., Donlan, M. E. and Surles, M. C. (1992): Looking at proteins: representations, folding, packing and design. *Biophys. J.* 63, 1186-1209.
- Riddle, D. S., Santiago, J. V., Bray-Hall, S. T., Doshi, N., Grancharova, Q. Y and Baker, D. (1997): Functional rapidly folding proteins from simplified amino acid sequences. *Nature structural biology* 4, 805-809.
- Rudolph, R., Siebendritt, R., Nesslauer, G., Sharma, A. and Jaenicke, R. (1990): Folding of an all- β protein: independent domain folding in GammaBII-crystallin from calf eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4625-4629.
- Slingsby, C. (1985): Structural variation in lens crystallins. *TIBS* 10, 281-284.
- Smith, G. P (1985): Filamentous Fusion Phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Stahl, S. and Uhlen, M. (1997): Bacterial surface display: trends and progress. *TIBTECH* 15, 185-192.
- Wistow, G. J. and Piatigorsky, J. (1988): Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 479-504.
- Wistow, G. J., Tumell, B., Summers, L., Slingsby, C., Moss, D., Miller, L., Lindley, P. and Blundell, T. (1983): X-ray analysis of the eye lens protein γ -II-crystallin at 1.9 \AA resolution. *J. Mol. Biol.* 170, 175-202.
- Young, N. M., MacKenzie, C. R., Narang, S. A., Oomen, R. P. and Baenziger, J. E. (1995): Thermal stabilization of a singlechain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. *FEBS Lett.* 377, 135-139.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kinston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1994): Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Crameri, A., Dawes, G., Rodriguez, E., Jr., Silver, S. and Stemmer, W. P. (1997): Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 5, 436-438.
- Kuchner, O. and Arnold, F. H. (1997): Directed evolution of enzyme catalysts. *TIBTECH* 15, 523-530.
- Pannekoek, H., von Meijer M., Schleef, R. R., Loskutoff, D. J. and Barbas, C. F. (1993): Functional display of human plasminogen-activator inhibitor 1 (PAI-1) on phages: Novel perspectives for structure-function analysis by errorprone DNA synthesis. *Gene* 128, 135-140.
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F. (1989): Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stemmer, W. P. C. (1994): Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389-391.
- You, L. and Arnold, F. H. (1996): Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng.* 1, 77-83.
- Zhang, J. H., Dawas, G. and Stemmer, W. P. (1997): Directed evolution of a fucosidase from a galectosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4504-4509.

Patentansprüche

1. Protein mit Beta-Faltblatt-Struktur, **dadurch gekennzeichnet**, daß oberflächenexponierte Aminosäuren in mindestens zwei oberflächenexponierten β -Strängen eines oberflächenexponierten Beta-Faltblatts gezielt derart mutagenisiert sind, daß das Protein neue oder verbesserte spezifische Bindungseigenschaften oder eine neue oder verbesserte katalytische Aktivität oder neue oder verbesserte Fluoreszenzeigenschaften aufweist.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Gruppe der Kristalline, Spheruline, Hitzebrüderproteine, Kälteschockproteine, β -Helix-Proteine, Lipocaline, Certine, Fibronectine oder Transkriptionsfaktoren gehört oder GFP, NGF, Tendamistat oder Lysozym ist.
3. Protein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kristallin aus Wirbeltieren, Nagern, Vögeln oder Fischen ist.
4. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Alpha-, Beta- oder Gamma-Kristallin ist.
5. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Gamma-II-Kristallin-Protein ist.
6. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein in einem Lösungsmittel und/oder einem Bindungspartner zugänglichen Bereich des Beta-Faltblatts mutagenisiert ist.

DE 199 32 688 A 1

7. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer β -Faltblattstruktur einer Domäne oder einer Untereinheit des Proteins mutagenisiert ist.
8. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Gamma-II-Kristallin ist, das durch Mutagenese einer oder mehrerer der Aminosäuren Lys 2, Thr 4, Tyr 6, Cys 15, Glu 17, Ser 19, Arg 36 und Asp 38 im Gamma-II-Kristallin erhalten wurde.
- 5 9. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein im Beta-Faltblatt so mutagenisiert wurde, daß es antikörperähnliche Bindungseigenschaften oder eine enzymatische (katalytische) Aktivität aufweist.
- 10 10. Protein nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es Bindungsspezifität für Estradiol oder dessen Konjugat BSA- β -Estradiol-17-Hemisuccinat aufweist.
11. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es Bindungsspezifität für Estradiol oder dessen Konjugat BSA- β -Estradiol-17-Hemisuccinat aufweist mit der nachfolgenden Aminosäuresequenz: Vgl. Abb. 8 und 10.
- 15 12. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es mit anderen Proteinen oder Nicht-Protein-Substanzen kombiniert ist.
13. DNA, die für ein Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
14. RNA, die von der DNA nach Anspruch 13 abgeleitet ist.
15. Prokaryotische oder eukaryotische Vektoren oder Zellen, enthaltend eine DNA oder RNA nach Anspruch 13 oder 14 oder Teile hiervon, die für funktionelle Bereiche des Proteins kodieren.
- 20 16. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche mit den nachfolgenden Schritten:
- Mutagenese der für ein Protein mit Beta-Faltblatt-Struktur kodierenden DNA, in solchen Bereichen, die für mindestens zwei oberflächenexponierte Beta-Stränge eines oberflächenexponierten Beta-Faltblatts kodieren.
 - Expression der in Schritt (a) erhaltenen Mutanten in einem geeigneten Expressionssystem; und
 - Selektion und Isolierung von Mutanten mit den gewünschten Bindungseigenschaften und/oder der gewünschten katalytischen Aktivität; wahlweise
 - Expression sowie Aufreinigung der im Beta-Faltblatt mutierten Proteine.
- 25 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutagenese eine Mutagenese spezifischer Aminosäurepositionen (Ortspezifische Mutagenese) oder nichtspezifischer Aminosäurepositionen (Randommutagenese) im Beta-Faltblatt umfaßt.
18. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutanten im Schritt b) in pro- oder eukaryontischen Zellen, im zellfreien System als Komplex mit Ribosomen oder auf der Oberfläche von pflanzlichen oder tierischen Zellen, Hefezellen oder Phagen, Viren oder Bakterien exprimiert werden.
- 30 19. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Selektion von Mutanten mit den gewünschten Bindungseigenschaften diese mit dem Bindungspartner in Kontakt gebracht und solche Mutanten isoliert werden, die die gewünschte Bindungsaaffinität aufweisen.
20. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Selektion von Mutanten mit den gewünschten katalytischen Eigenschaften diese mit ihrem Substrat in Kontakt gebracht und solche Mutanten isoliert werden, die die gewünschte katalytische Aktivität aufweisen.
- 40 21. Verwendung eines Proteins nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in der Diagnostik und Therapie, in der Kosmetik, der Bioseparation und Biosensorik und der Schadstoffverringerung.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

Abb. 1

GCLIE1B: Biotin-

CGCGCGCGTCTCACAAAGATAACATGCCATGACTCGCGGCCAGCC

GCLIE2P: P-

CCCCATGGCCGGCTGGGCCGCGAGTCATGGCATGTATTTGTGAGACGCGCG

GCLI3P: P- GGCATGGGGNNKATCNKTTNNKGAGGACCGGGG

GCLIB4P: P- GTGGCCCTGGAAGCCCCGGTCCTC

GCLI5P: P-

CTTCCAGGGCCACNNKTACNNKTCNNKAGCGACTGCCCAACC

GCLI6P: P- TGCA GCCCTATTCAGCCGC

GCLIB7P: P-

GATGGAGTTACAGCGGCTGAAATAGGGCTGCAGGTTGGGCAGTCGC

GCLI8P: P-

TGTAACCTCCATCNNKGTGNNKAGCGGCTGCTGGATGCTGTATGAG

GCLIE9P: P- CGCCCCAACTACCAGGGTCACCAGTACCCCTGCGGC

GCLIE10:

GCCGCAGGAAGTACTGGTAGCCCTGGTAGTTGGGCGCTACAGCATC

GCLIA11B: Biotin- CCATCAGCCCCATCAGCGAACTTGCCGCAGGAAGTACTGG

P: Phosphat, N: A/C/G/T, K: T/G

Abb. 2

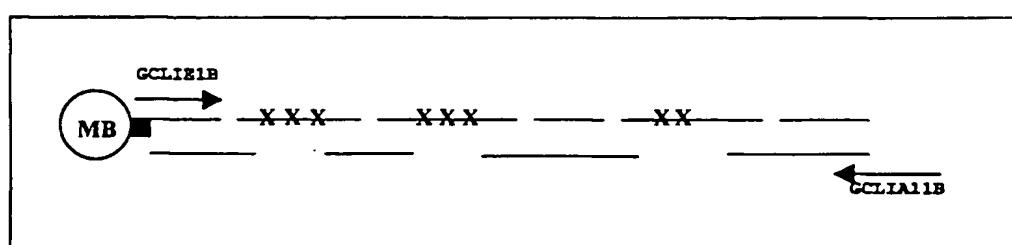


Abb. 3

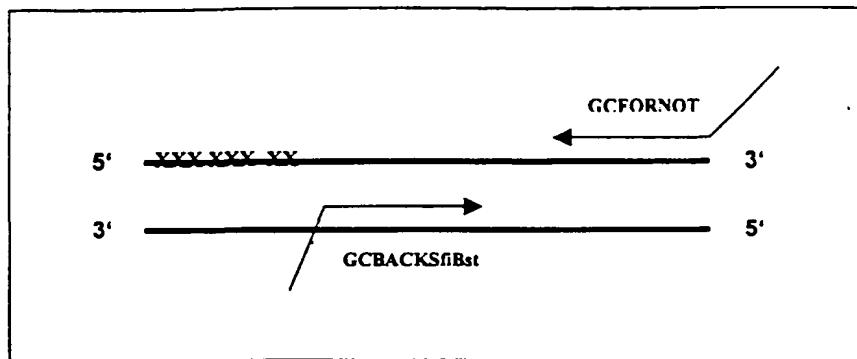


Abb. 4

GCFORNOT: 5' GAGTCATTCTGCGGCCGCATAAAAATCCATCACCCGTCTAAAGAAC
3'

GCBACKSflBst: 5'

GCGGCCAGCCGGCCGCTGGATGCTGTATGAGCGCCCCAACTACCAGGGTCACC
AG 3'

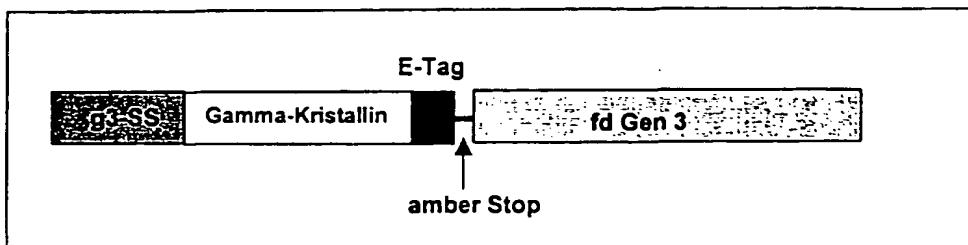
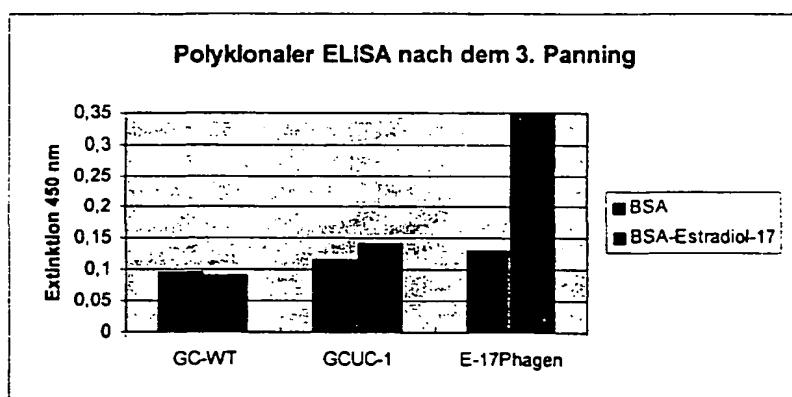
Abb. 5**Abb. 6**

Abb. 7

Mu 12A:

GGCCCAGCCGGCCATGGGGAGGATCAAGTTAAAGAGGGACCGGGGCTTCCAGGGCCA
CTATTACAGTTCAATAGCGACTGCCCAACCTGCAGCCCTATTCAGCCGCTGTAAC
CCATCAGGGTGCTGAGCGGCTGCTGGATGCTGTATGAGCGCCCCAACTACCAGGGTCA
CC

WT:

GGCCCAGCCGGCCATGGGGAAAGATCACTTTTACGAGGGACCGGGGCTTCCAGGGCCA
CTGCTACGAGTGCAGCAGCGACTGCCCAACCTGCAGCCCTATTCAGCCGCTGTAAC
TCCATCCCGCGTGGACAGCGGCTGCTGGATGCTGTATGAGCGCCCCAACTACCAGGGC
CACC

Abb. 8

Mu 12A:

AAQPAMGRIKFEDRGFQGHYYSCNSDCPNLQPYFSRCNSIRVLSGCWMLYERPNYQGH
QYFLRRGDYPDYQQWMGFNDSIRSCLRIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQ
DRFHLETVHSLNVLEGSWLYEMPSYRGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKVGSLLRVMD
FYAAAGAPVPYPDPLEPRAA

WT:

AAQPAMGKITFYEDRGFQGHCYECSSDCPNLQPYFSRCNSIRVDSGCWMLYERPNYQGH
QYFLRRGDYPDYQQWMGFNDSIRSCLRIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQ
DRFHLETVHSLNVLEGSWLYEMPSYRGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKVGSLLRVMD
FYAAAGAPVPYPDPLEPRAA

Abb. 9

GC 20bbackWT: 5' GGGATTCCATATGGGGAGGATCACTTTTACG 3'
 GC 20bback12A: 5' GGGATTCCATATGGGGAGGATCAAGTTAAAG 3'
 GC for 20b: 5' CGCGGATCCGAATAAAATCCATACCCCG 3'

Abb. 10

Mu 12A-HIS:

MGRIKFKEDRGFQGH^YSCNSDCPNLQPYFSRCNSIRVLSGCWMLYERPNYQGHQYFLR
 RGDYPDYQQWMGFNDSIRSCRLIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQDRFHL
 TEVHSLNVLEGSWVLYEMPSYRGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKV GSLRRVMDFYSDP
NSSSVDKLAAALEHHHHHH

WT-HIS:

MGKITFYEDRGFQGH^CYECSSDCPNLQPYFSRCNSIRVDGCWMLYERPNYQGHQYFLR
 RGDYPDYQQWMGFNDSIRSCRLIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQDRFHL
 TEVHSLNVLEGSWVLYEMPSYRGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKV GSLRRVMDFYSDP
NSSSVDKLAAALEHHHHHH

Abb. 11

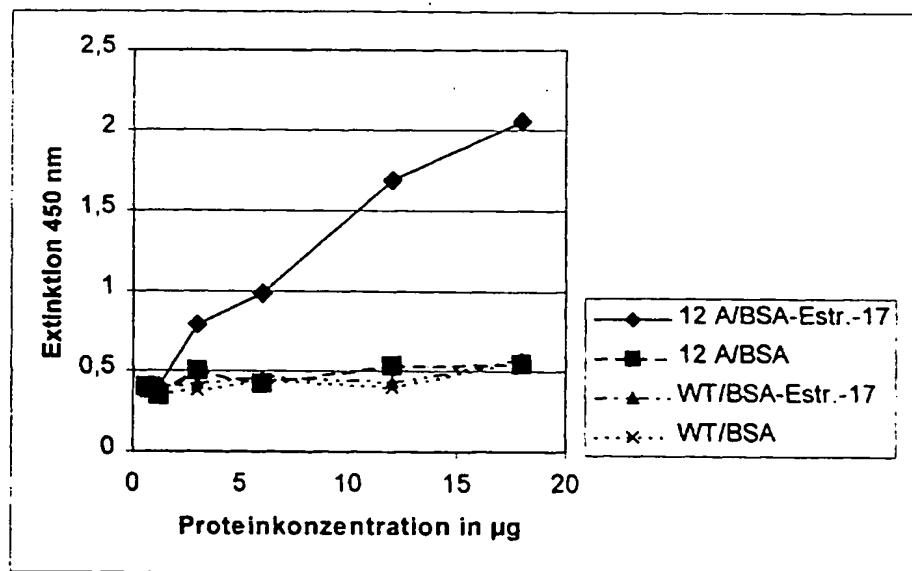


Abb. 12

